

GABRIELA ANTON

RODICA REPANOVICI

TEHNOLOGIA CLONĂRII GENELOR

GENERALITĂȚI ȘI APLICAȚII



EDITURA ACADEMIEI ROMÂNE



Scanned with OKEN Scanner

575.1

578.

- genetică
- ereditate
- virologie
- GABRIELA ANTON

RODICA REPANOVICI

TEHNOLOGIA CLONĂRII GENELOR

GENERALITĂȚI ȘI APLICAȚII

Copyright © Editura Academiei Române, 2003.
Toate drepturile asupra acestei ediții sunt rezervate editurii.

Adresa: EDITURA ACADEMIEI ROMÂNE
Calea 13 Septembrie nr. 13, sector 5,
P.O. Box 5-42, 050711
București, România,
Tel.: 4021-411 90 08
4021-410 32 00
Fax: 4021-410 39 83
e-mail: edacad@ear.ro
web: www.ear.ro

LUCRARE EDITATĂ CU SPRIJINUL
MINISTERULUI EDUCAȚIEI, CERCETĂRII ȘI TINERETULUI

Redactor: IRINA FILIP
Tehnoredactor: MARIA CRISTOGEL
Coperta: GIGI GAVRILĂ

Bun de tipar: 23.IX.2003. Format: 16/70 × 100
Coli de tipar: 13,25
C.Z. pentru biblioteci mari: 575.1: 578.08
C.Z. pentru biblioteci mici: 57

ISBN: 973-27-0989-8

Imprimat în România

*Cei mai curajoși sunt desigur aceia care au
viziunea cea mai clară asupra a ceea ce este în fața lor,
glorie sau pericol în egală măsură, și nu pregetă să-i
iasă în întâmpinare.*

Tucidide

CUPRINS

Introducere	11
1. Relația acizi nucleici-proteine	17
1.1. Particularități întâlnite la procariote	19
1.2. Particularități întâlnite la eucariote	22
1.3. Exprimarea genelor eucariote în sistem procariot	28
2. Transferul de informație genetică	31
2.1. Transferul de informație genetică la procariote	31
2.1.1. Recombinarea genetică	31
2.1.2. Transformarea	32
2.1.3. Conjugarea	33
2.1.4. Transducția	34
2.1.5. Transfecția	35
2.1.6. Tehnologia ADN recombinat	35
2.2. Transferul de informație genetică la eucariote	36
2.2.1. Hibridarea celulară	36
2.2.2. Minicelulele	37
2.2.3. Transferul de gene mediat de nucleu	37
2.2.4. Transferul de gene mediat de cromozomi	38
2.2.5. Transferul de gene mediat de ADN purificat	39
2.2.6. Tehnologia ADN recombinat	39
2.3. Schema generală a tehnologiei ADN recombinat (transferul artificial de gene)	39
2.3.1. Schema inițială	40
2.3.2. Schema actuală	41
3. Enzime utilizate în tehnologia ADN recombinat	43
3.1. Nucleaze	43
3.1.1. Nucleaze nespecifice	43
3.1.2. Nucleaze specifice	47
3.2. Polimeraze	53
3.2.1. ADN polimeraze	53
3.2.2. ARN polimeraze	56
3.3. Ligaze	57
3.4. Alte enzime	59
3.4.1. ADN metiltransferaze	59
3.4.2. Pronază E	60
3.4.3. Proteinază K	61

3.4.4. Fosfataze alcaline	61
3.4.5. Polinucleotidkinază sau PNK	62
3.4.6. Topoizomerază I	62
4. Vectori	64
4.1. Plasmide	64
4.1.1. Proprietățile plasmidelor	65
4.1.2. Vectori plasmidiali	67
4.1.3. Tipuri de vectori plasmidiali de exprimare	74
4.1.4. Alte tipuri de vectori plasmidiali	76
4.1.5. Vectori suveică (<i>shuttle vectors</i>)	77
4.2. Vectori fagici	79
4.2.1. Bacteriofagul λ	79
4.2.2. Vectori derivați de la genomul fagului λ	84
4.2.3. Vectori derivați de la genomul bacteriofagilor filamentoși	86
4.2.4. Fagemide	90
4.2.5. Cosmide	92
4.3. Vectori virali eucarioti	95
4.3.1. Criteriile pentru designul unui vector viral mamalian	95
4.3.2. Vectori derivați de la adenovirusuri	96
4.3.3. Vectori derivați de la virusul Epstein-Barr (EBV)	98
4.3.4. Vectori derivați de la virusul herpes simplex (HSV1)	101
4.3.5. Vectori derivați de la virusul simian vacuolizant (SV40)	106
4.3.6. Vectori derivați de la virusuri papiloma (PV)	111
4.3.7. Vectori derivați de la poxvirusuri	112
4.3.8. Retroelemente	115
4.3.9. Vectori derivați de la retrovirusuri	116
4.3.10. Vectori derivați de la baculovirusuri	122
4.3.11. Vectori derivați de la caulimovirusuri	127
4.4. Vectori derivați de la drojdii	128
4.5. Plasmida Ti	134
5. Pasagerul	138
5.1. Metode de obținere	138
5.1.1. Metode mecanice	138
5.1.2. Metode enzimatică	139
5.1.3. Metode chimice	144
6. Metode de evidențiere a transferului de gene	151
6.1. Tehnici de decelare a acizilor nucleici	152
6.1.1. Restricția enzimatică	152
6.1.2. Hibridizarea acizilor nucleici	153
6.1.3. Reacția de amplificare polimerazică (PCR)	154
6.1.4. Determinarea secvenței bazelor	155
6.2. Tehnici de decelare a proteinelor exprimate	160
6.2.1. Analiza Western blot	161
6.2.2. ELISA	161

7. Aplicații	162
7.1. Obținerea somatostatinei	163
7.2. Obținerea insulinei	165
7.3. Obținerea urokinazei	166
7.4. Obținerea vaccinului antihepatită B	166
7.5. Obținerea vaccinului antirabic	168
7.6. Terapia genică umană	170
7.6.1. Terapia ADA	176
7.6.2. Terapia genică în cancer	177
7.7. Plante transgenice	182
7.8. Animale transgenice	186
7.8.1. Metode de introducere a genelor străine la animale	187
7.9. Băncile de gene	192
7.10. Perspective	195
8. Măsuri de protecție	198
8.1. Măsuri de protecție biologică	198
8.2. Măsuri de protecție fizică	200
Bibliografie selectivă	202
Contents	209

INTRODUCERE

Ingineria genetică, termen care părea să caracterizeze o noțiune din domeniul științifico-fantastic, constituie astăzi o realitate bine conturată, făcând zi de zi progrese cu perspective încă greu de estimat. Dacă prima parte a secolului trecut a fost dominată de revoluția în fizică – a cărei coloană vertebrală o constituie fizica atomică, cea de a doua jumătate a secolului XX a fost sub semnul revoluției în biologie. Realizările spectaculoase obținute în perioada care a trecut de la introducerea diverselor tehnologii bazate pe inginerie gen(et)ică au determinat oamenii de știință să anticipeze că secolul XXI va fi dominat de aceasta, alături de tehnicile informatice.

Ingineria gen(et)ică nu este o disciplină de sine stătătoare, ci poate fi definită ca un ansamblu de metode și de tehnologii efectuate *in vitro* cu gene, cromozomi și, uneori, cu celule întregi, în scopul „construirii” unei structuri cu proprietăți (eventual ereditare) determinate. Se poate deci afirma că această nouă ramură a biologiei a inaugurat era intervenției umane active asupra patrimoniului ereditar al organismelor.

Practic, această tehnologie – cu multiplele ei repercusiuni asupra dezvoltării științei și cu impactul lor social – a determinat trecerea unui obstacol care părea greu de depășit pentru biologie, și anume transferul de informație genetică de la o specie la alta. După cum este cunoscut, în natură are loc în mod curent un proces de recombinare a genelor între specii înrudite, dar frecvența lui este relativ scăzută. Or, tehnologia ADN recombinat permite ca în urma fragmentării specifice (a restricției), „în eprubetă” a diferitelor genoame și după ligarea lor la alte fragmente genice și introducerea în celule adecvate să se asigure exprimarea mesajului străin. În acest fel s-a creat posibilitatea combinării după dorință a unor molecule de ADN (în care este înscrisă informația ereditară a ființelor vii) de la specii de organisme total neînrudite și a obținerii unor organisme noi, cu caracteristici neîntâlnite în natură (bacterii care „fabrică” hormoni umani sau alte substanțe proteice de interes, pentru care inițial nu dispuneau de informația genetică necesară).

Tehnologiile agricole sau industriale clasice nu mai pot face față integral cerințelor din ce în ce mai mari ale societății contemporane sau ale celei viitoare, mai ales în condițiile exploziei demografice, astfel că a apărut necesară imaginarea unor noi procedee, mai productive, mai puțin poluante, cu un consum energetic cât mai scăzut.

Posibilitatea manipulării materialului genetic și a trecerii barierelor dintre specii se datorează unor descoperiri epocale privind structura și funcția ADN,

transformările calitative profunde produse în biologia secolelor XIX și XX fiind enumerate în continuare.

În 1859 Darwin, în a sa *On the Origin of Species by Means of Natural Selection*, a avansat ideea conservării speciilor favorizate în lupta pentru viață. Câteva ani mai târziu, experimentele lui Mendel (1865) pe mazăre au demonstrat transmiterea caracterelor ereditare prin „unități discrete”. Miescher (1869) a izolat din leucocitele din puroi o substanță pe care a denumit-o „nucleină”. Peste încă 10 ani, Flemming (1879) a observat la microscop mitoza celulelor de embrion de salamandă, introducând termenii – în vigoare și astăzi – de *profază*, *metafază*, *anafază*.

La rândul său, Johannsen (1909) a utilizat pentru prima oară noțiunea de *genă* pentru descrierea unității mendeliene a eredității. Morgan și colab. (1911, 1915), pe baza studiilor lor pe *Drosophilla melanogaster*, au arătat că genele sunt organizate sub forma cromozomilor. Cercetările întreprinse de către Beadle și Tatum (1941) pe modelul *Neurospora crassa* au dus la elaborarea modelului „o genă – o enzimă”. Au fost reluate și lucrările asupra „nucleinei” lui Miescher, Astbury dovedind prin difracție cu raze X că este vorba despre o moleculă cu o structură regulată și periodică, cu aspect „de monede într-un fișic”. În sfârșit, Avery și colab. (1944) au precizat că ADN (un „principiu transformant”) reprezintă substratul chimic al eredității; dovedind că manipularea ADN permite transformarea unui tip de organism în altul, ei au pus bazele „transferului de informație” *in vitro*. În același an, McClintock (1944) a descoperit „genele săltărețe” (*jumping genes*, transpozonii) din jurul cromozomilor, arătând că patrimoniul ereditar este mult mai dinamic și modulabil decât se credea. Hershey și Chase (1952) au constatat că fagii provoacă infectarea bacteriilor prin „injectarea” genomului.

Watson și Crick (1953), pe baza uneia din regulile lui Chargaff (1951) – $(A+G)/(T+C) = 1$ – au elaborat modelul bicatenar al moleculei de ADN, care a permis explicarea principalelor fenomene biologice (replicarea, transcrierea și traducerea). Dogma centrală a biologiei moleculare a permis înțelegerea trecerii de la un limbaj de nucleotide la limbajul aminoacizilor, deci a arătat sensul fluxului informației genetice, de la acizii nucleici la proteine. S-a ajuns în acest fel la „materializarea” caracterelor ereditare care definesc speciile și indivizii printr-o structură unică, ce poate fi regăsită în toate moleculele de ADN din celulele somatice, reunite sub forma unuia sau mai multor cromozomi. Pe baza modelului dublu catenar al ADN, Meselson și Stahl (1958) au propus modelul replicării semiconservative a acestei molecule purtătoare de informație genetică. Anul 1961 a adus descoperirea ARNm (Brenner, Jacob și Meselson), cel care face legătura între ADN și proteine. Nirenberg și Matthaei, Ochoa (1966) și alți cercetători au stabilit codul genetic, universal și degenerat – în care tripleta AUG constituie semnalul de start al traducerii, iar codonii UAG, UAA, UGA stopează procesul; acest cod a permis ulterior transferul de informație între organisme aparținând unor specii înrudite sau total neînrudite.

În perioada 1966–1970, Arber și colab. s-au ocupat de studiul fenomenelor de restricție și modificare în sistemul fag-bacterie, ceea ce a dus ca în 1968 Smith, Wilcox și Kelley să descopere o clasă de endonucleaze specifice, denumite *enzime de restricție*, care hidrolizează moleculele de ADN în mod reproductibil și controlat; această observație a revoluționat capacitatea de manipulare a ADN. Mandel și Higa (1970) au pus la punct un procedeu eficient de transfer al moleculelor ADN la alte celule decât cele de origine, iar, mai târziu, Sgaramella și Khorana (1972) au evidențiat posibilitatea de „sudare” a fragmentelor ADN având origini diferite, cu ajutorul ligazelor, existente atât în celulele normale, cât și în cele infectate cu virusuri.

În 1973 a fost clonată în *E. coli* prima genă animală, provenind de la *Xenopus laevis* (Morrow și colab., 1974). Sharp și colab. (1973) au elaborat o metodă simplă de vizualizare directă a moleculelor de ADN, prin colorare cu bromură de etidiu și excitare cu radiații UV, ceea ce a ușurat foarte mult tehnicile de analiză a acizilor nucleici și de estimare a maselor lor moleculare.

Anul 1975 este anul conferinței de la Asilomar, unde s-au stabilit principiile bioetice ale manipulării ADN de la diverse specii, cu elaborarea primului *Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules*, revizuit continuu.

Roberts și Sharp (1977) au semnalat existența discontinuităților genelor eucariote, fapt observat apoi în numeroase alte cazuri de către diverși cercetători. S-a arătat astfel că ARNm eucariot este frecvent mai mic decât gena care îl codifică.

A urmat obținerea primelor organisme transgenice, cum ar fi șoarecii și *Drosophilla*. La Los Alamos s-a constituit GenBank Database (1982). Prima genă umană cartată a fost anunțată în 1983; ea corespunde genei pentru maladia Huntington, se află plasată la nivelul cromozomului 4 și va fi izolată abia în 1993. Tot în 1983, Mullis anunță procedeul de amplificare a ADN *in vitro*, prin PCR (*polymerase chain reaction*).

Ulterior, s-au identificat localizările cromozomale în cazul altor maladii genice și s-au executat primele hărți genetice ale genomului uman, utilizând RFLP (*restriction fragment length polymorphism*, 1987). În 1989 au fost descoperiți microsateliții (secvențe de ADN formate din 2–4 pb, repetate în tandem de un număr variabil de ori în populație, ceea ce permite utilizarea lor ca markeri), precum și STS (*sequence-tagged site*; secvență unică de ADN, ușor detectabilă prin PCR, cu rol în cartarea fizică).

În 1990 a început *Proiectul genomului uman*, care presupune cartarea genelor, dar și secvențializarea celor circa 3 miliarde pb ale patrimoniului ereditar uman. 1992 este anul publicării unei hărți genetice umane, de rezoluție joasă, pe baza identificării microsateliților la nivelul genomului complet.

Un moment deosebit este cel din 1993, când FDA (*Food and Drug Association*, din Statele Unite) a aprobat comercializarea primului aliment modificat genetic (așa-numita roșie FLAVR SAVR), după ce cu zece ani în urmă fuseseră lansate pe piață primele proteine umane cu rol de medicament, produse

prin tehnologia ADN recombinat (insulina, factorul VIII de coagulare, hormonul uman de creștere etc.).

Apoi, lucrurile s-au precipitat și s-a raportat harta genetică detaliată (1994), secvențializarea completă a genoamelor de la două microorganisme (*Mycoplasma genitalium* – cel mai mic genom, de 580 070 pb, cu circa 470 gene și *Haemophilus influenzae* – cu 1 830 137 pb, ceva peste 5% din dimensiunea genomului uman!). Harta genetică murină completă a fost raportată în 1996, constatându-se că la genoame aproximativ egale ca dimensiuni, omul și șoarecele prezintă circa 85% similarități structurale, dar organizări diferite: 20 de cromozomi la murine, 23 – la specia umană. Tot în același an s-a terminat secvențializarea genomului de drojdie (circa 12 milioane pb, organizate în 16 cromozomi), cu aproximativ 6 000 de gene, dintre care o treime sunt înrudite cu cele umane.

Ca urmare a acumulării unei cantități impresionante de date, comunitatea științifică internațională a luat hotărârea ca acestea să fie de uz general, nesecretizate, elaborându-se așa-numitele *principii Bermuda* (1997). Genomul „vedetei” geneticii – *E. coli*, cu cele 4,6 milioane pb și circa 3000 de gene, a fost descifrat integral (1997), pentru ca în 1998 să fie cunoscută secvența ADN din *Mycobacterium tuberculosis* (4,4 milioane pb), dar și a viermelui *Caenorhabditis elegans* (cu 97 milioane pb, repartizate în 6 cromozomi cu 20 000 de gene). În sfârșit, în anul 2000 se realizează secvențializarea genomului de *Drosophilla* (180 milioane pb), constatându-se o similaritate de 87% cu genomul uman.

În ceea ce privește genomul uman, s-a raportat secvențializarea cromozomului 22 (al cărui braț *q* este foarte bogat în gene; el are 33,4 milioane pb, cu 545 gene, 1999) și a cromozomului 21 (a cărui extracopie provoacă apariția sindromului Down; cromozomul respectiv are 33,5 milioane pb și ceva mai puțin de 300 gene). În 2001 a fost elaborată prima versiune completă a genomului uman.

În ultimii 30 de ani s-a înregistrat o modificare radicală a modalităților de abordare a problemelor de biologie, ceea ce a dus la o mai profundă înțelegere a funcționării sistemelor vii. Cantitatea mare de informație din celulele organismelor superioare – inclusiv omul – a putut fi studiată și descifrată cu ajutorul sistemelor bacteriene. Genele respective, desprinse din contextul genomului în care sunt integrate, au fost clonate și amplificate cantitativ în celule procariote, realizându-se o creștere exponențială a cunoștințelor, cu beneficii nu doar fundamentale, ci și cu mari implicații, mai ales în științele medicale.

Dezvoltarea menționată a avut loc datorită studiilor anterioare aprofundate asupra geneticii *E. coli* și a fagilor corespunzători. Aceste sisteme simple au permis stabilirea modului de alcătuire a genelor, a structurii și funcționării lor.

Toate aceste descoperiri, coroborate și cu altele, au dus în timp relativ scurt la apariția unor noi domenii de cercetare, cum ar fi biologia moleculară sau ingineria genetică. Până în prezent s-au pus la punct o serie de procedee de inginerie genetică, între care *tehnologia ADN recombinat* sau *a clonării genelor*, care s-a dovedit deosebit de productivă în cei aproape 30 de ani de când a fost recunoscută

ca atare. La începutul anilor '70, la o întâlnire americano-japoneză, s-a prezentat o comunicare privind atât transformarea eficientă a unor celule de *E.coli* cu ajutorul unui ADN plasmidial, cât și proprietățile clonei conținând progenii unei singure plasmide. La aceeași reuniune, o altă lucrare a fost consacrată hidrolizei unor ADN plasmidiali cu ajutorul enzimelor de restricție, cu obținerea dintr-o moleculă circulară – conformația de bază a acestor elemente epizomale – a unei molecule liniare, având capete terminale identice.

Cele două lucrări au dat noi idei, atât realizatorilor lor – Cohen, respectiv Boyer – cât și altor cercetători prezenți, materializându-se în timp record de numai trei luni prin apariția „certificatului de naștere” a tehnologiei ADN recombinat: lucrarea *Construcția in vitro a plasmidelor bacteriene biologice funcționale*. A fost astfel construită prima *himeră biologică moleculară*, prin ligarea în eprubetă a două fragmente de ADN provenind de la plasmide diferite. Această construcție artificială s-a comportat ca o moleculă de sine stătătoare, ca un replicon funcțional, prezentând proprietățile chimice și genetice ale ambilor parentali.

Din 1980 a început brevetarea organismelor himeră realizate prin inginerie genetică, în general, și prin tehnologia ADN recombinat, în special.

1973 reprezintă deci anul care marchează inaugurarea erei intervenției umane asupra patrimoniului genetic, ceea ce s-a tradus prin „construirea” unor organisme cu proprietăți necunoscute în natură, prin crearea cărora au putut fi depășite barierele naturale dintre specii. Tehnologia clonării genelor presupune construirea de molecule noi de ADN din fragmente de genoame provenind de la specii diferite sau chiar de la aceeași specie, dar ordonate artificial, astfel încât să apară o structură genetică nouă. Importanța acestui domeniu constă în următoarele:

- din punct de vedere fundamental oferă posibilitatea investigării materialului genetic, permițând studiul intim al organizării genelor în cromozomi; de asemenea, permite clonarea genelor sau a fragmentelor de gene, ceea ce duce la studiul structurii lor, al elementelor care le condiționează funcționarea și exprimarea;

- din punct de vedere aplicativ-economic are o mare importanță, deoarece produce polipeptide (proteine) aproape imposibil de obținut prin sinteză chimică, pe baza mijloacelor convenționale. Clonarea unei gene eucariote într-o bacterie (v. insulina sau somatostatina etc., polipeptide care nu reclamă o prelucrare posttranscripțională) duce la sinteza rapidă și în cantitate mai mare, datorită ratei mai mari de multiplicare a celulelor bacteriene. În același timp, face posibilă diagnosticarea unor maladii și, în perspectivă, terapia sau prevenirea acestora (de exemplu, prin vaccinuri etc.), la om și la animale; la ora actuală există numeroase aplicații în industrie, agricultură, medicină.

Pe baza tehnologiei ADN recombinat, dar și a celorlalte tehnici de inginerie genetică s-a creat o ramură nouă – *biotehnologia* modernă, domeniu care are ca obiectiv utilizarea integrată a biochimiei, a microbiologiei și a industriei chimice, pentru realizarea unor aplicații tehnologice bazate pe activitatea microorganismelor, a culturilor celulare și tisulare vegetale și animale, precum și a unor enzime (de

obicei immobilizate pe suport solid). O altă definiție a biotehnologiei face referire la un sistem de concepte și tehnologii rezultate din îmbinarea biochimiei, a microbiologiei, a ingineriei chimice, cu utilizarea proceselor biologice pentru sinteza diferitelor substanțe și pentru protecția mediului înconjurător.

Ca orice activitate umană, și tehnologia ADN recombinat prezintă limite, legate de tipul de celule implicate. Astfel, celulele *E.coli* au un cromozom de circa 3 000 de gene. Modificarea bacteriei la nivelul unei singure gene induce doar o mică diferență față de parental, diferență care poate fi însă esențială. La eucariote, proporția genă modificată-genom depinde de scara de evoluție pe care se află celulele respective. La om, care are circa 30 000–50 000 de gene, modificarea uneia singure reprezintă foarte puțin din punct de vedere cantitativ, dar efectele pot fi majore. Dacă unei bacterii i se „grefează” o genă umană, deși ea reprezintă numai 1/3 000 din genom, aceasta poate fi astfel introdusă încât să producă circa 5% din toate proteinele celulare!

Modelul cel mai simplu de efectuare a transferului de informație genetică, adică de adevăr transmis cu semnificația umană de *mesaj*, este redat de schema tehnologiei ADN recombinat. Teoretic, parcurgând o astfel de schemă se poate obține orice combinație de material genetic își propune experimentatorul care, deja, poate fi asimilat „inginerului care concepe designul organismului-hibrid”.

Dintre diferitele procedee folosite de ingineria genetică până în acest moment, cea mai prodigioasă s-a dovedit a fi *tehnologia ADN recombinat* sau *tehnologia clonării genelor*, ale cărei baze moleculare vor fi prezentate în volumul de față, care, la rândul său, constituie ediția a doua, revizuită și adăugită a cărții *Tehnologia DNA recombinant*, apărută în Editura Științifică și Enciclopedică, în 1982, autori Liviu M. Popa și Rodica Repanovici.

RELAȚIA ACIZI NUCLEICI-PROTEINE

Descoperirea și elucidarea relației existente între acizii nucleici și proteine reprezintă una dintre cele mai importante realizări ale biologiei moderne. Așa după cum au demonstrat Avery și colab. (1944) sau Boivin și colab. (1948) etc., acizii nucleici constituie purtătorii informației ereditare. În schimb, proteinele îndeplinesc roluri structurale și catalitice indispensabile vieții celulare. Ca o consecință a acestei situații a rezultat că organizarea fundamentală a organismelor se bazează tocmai pe relația acizi nucleici-proteine (polipeptide); în această relație, pentru existența și funcția ambelor componente esențiale ale celulei, este necesară interdependența lor. Rolul principal al acizilor nucleici este acela de a specifica, dirija și controla sinteza proteinelor (incluzând toate procesele care stabilesc structura lor primară, secundară și terțiară, momentul lor de apariție și rata lor de producere).

După descifrarea structurii dublu helix a moleculei ADN (Watson și Crick, 1953), s-a ajuns la concluzia că informația genetică a organismelor este conservată în această moleculă sub forma succesiunii elementelor de bază – nucleotidele. Concomitent cu dezvoltarea cunoștințelor despre organizarea intimă a materialului genetic și a mecanismelor care guvernează transmiterea informației ereditare, noțiunea de genă a suferit numeroase modificări. La introducerea sa, conceptul de genă definea această entitate ca fiind o regiune operațională a genomului, care segregă ca o singură unitate în cursul meiozei și dă naștere unei trăsături fenotipice definite. Ulterior, s-a demonstrat că gena corespunde acelei lungimi de ADN din genom care conține informația necesară pentru sinteza unei singure proteine. Deoarece numeroase proteine biologice active sunt formate din mai multe lanțuri de aminoacizi, s-a considerat că este corectă afirmația „o genă – un polipeptid”; actualmente, această paradigmă trebuie înlocuită eventual cu o alta, care afirmă că „o genă codifică mai multe proteine (polipeptide)” datorită procesului de splicing alternativ (v. acolo). În plus, descoperirea virusurilor cu genom ARN a dus la extinderea conceptului respectiv. Așadar, în acest moment, *gena* (unitatea fizică și funcțională a eredității transmisă de la parentali la progeni) este considerată ca o *secvență de ADN de-a lungul unui cromozom, care codifică informația pentru sinteza unui polipeptid specific (component al proteinelor) sau pentru un alt produs funcțional (ARNm, ARNt etc.)*.

inv. 157085

Deci, cu unele excepții, mesajul genetic sau informația genetică pentru sinteza unui anumit polipeptid este înscris în dubla elice de ADN, de unde este transcrisă într-o moleculă ARN, cu ajutorul enzimei specifice ARN polimeraza-ADN dependentă. Enzima realizează copierea secvenței bazelor din ADN într-o secvență complementară de baze specifice ARN. Deoarece această moleculă transferă informația de la ADN la ribozomi (sediul biosintezei proteinelor), el a fost denumit ARN mesager (ARNm). O dată sintetizat, el pătrunde în citoplasma celulei, unde la nivelul ribozomilor (organite formate din proteine și ARNr) mesajul se traduce din limbajul de nucleotide la cel de aminoacizi, cu sinteza proteinelor specifice; acestea prezintă o anumită structură primară, care condiționează o configurație macromoleculară unică. Procesul de traducere a informației genetice este deosebit de complex, iar la realizarea lui participă – alături de ribozomi și ARNm – o serie de proteine (factori și enzime), precum și un acid ribonucleic specific ARNt, care selecționează aminoacizii conform codului din ARNm.

Transferul de informație genetică implică două procese discrete și consecutive – transcrierea și traducerea (translația). Legătura între ADN și proteine se realizează prin intermediul diferitelor specii de ARN. Transcrierea urmează același mecanism chimic ca și replicarea ADN, doar că are loc pe o singură catenă ADN (așa numita *catenă sens*, care este orientată 3'→5'). Conform rolului lor, ARN se împart în două clase distincte (specii funcționale și specii structurale), după cum rezultă din tabelul 1.

Tabelul 1

Clase de molecule ARN

Clase de ARN	Dimensiuni aproximative (pb)	Număr aproximativ de specii în celulă (pb)	Funcție	Distribuție
mesager ARNm	variate	>10 000	funcțional, transfer de informație	PK ¹ EK ²
ARNr 5S	120	1–2	structural, al subunității ribozomale mari	PK EK
ARNr 16S/18S	1600/1900	1	structural, al subunității ribozomale mici	PK/EK
ARNr 23S/28S	3200/5000	1	structural, al subunității ribozomale mari	PK/EK
ARNr 5,8S	155	1	structural, al subunității ribozomale mari	PK/EK
ARNt	75–90	100	traducere AN→polipeptide	PK/EK
ARNhn ³	variate	>10 000	precursor ARNm	EK
ARNsn ⁴	50–230	zeci	prelucrarea ARN	EK

¹PK – celule procariote; ²EK – celule eucariote; ³hn (*high nuclear*) – ARN nuclear cu masă moleculară mică; ⁴sn (*small nuclear*) – ARN nuclear cu masă moleculară mare.

Astfel, orice celulă – procariotă sau eucariotă – conține mai multe mii de copii de ARNm, transcrise de la diferite gene, fiecare fiind un potențial producător de proteine. Rata de tranzit a ribozomului de-a lungul ARNm este relativ constantă; în condiții optime, 100 de aminoacizi sunt înglobați în polipeptide într-un interval de 2,5 sec. La rândul său, numărul ribozomilor atașați la un anumit ARNm determină viteza procesului de transcriere, existând proporționalitate cu numărul moleculelor proteice. Lanțurile polipeptidice conțin în ele însele informațiile care direcționează prelucrarea posttranslațională și compartimentarea celulară.

Întrucât în ultimii 30 de ani s-a înregistrat o modificare radicală a modalităților de investigare în domeniul biologiei, s-a ajuns la o mai profundă înțelegere a funcționării sistemelor vii. Cantitatea mare de informație din celulele organismelor superioare – inclusiv omul – a putut fi studiată și descifrată, inclusiv cu ajutorul sistemelor bacteriene.

1.1. PARTICULARITĂȚI ÎNTÂLNITE LA PROCARIOTE

În mod esențial, dezvoltarea și funcționarea unui organism constă dintr-un sistem de reacții chimice integrate, controlate de către gene. Încă din deceniul 5 al secolului trecut s-a presupus că genele care fac parte dintr-un sistem controlează și reglează reacțiile specifice prin produsul lor de exprimare, fie acționând direct ca enzime, fie prin determinarea specificității enzimelor. Descifrarea relației existente între gene și proteine s-a făcut pe calea urmăririi schimbărilor structurii proteinelor în funcție de modificările induse în structura genelor, adică prin mutații.

Cercetările efectuate preferențial asupra *E.coli* și asupra fagilor corespunzători au permis precizarea modului de alcătuire a genelor, a structurii și funcționării lor. Astfel, celulele procariote – în organizarea cărora nu există nucleu – au un singur cromozom, cu circa 3×10^6 pb. S-a calculat că o genă de dimensiune medie conține 900–1 000 pb, ceea ce corespunde unui polipeptid mediu de 300 de aminoacizi. În aceste condiții, o bacterie ar avea o capacitate de codificare de aproximativ 3 000 de produși polipeptidici diferiți, cifră în bună concordanță cu realitatea. Trebuie însă reținut că o parte a informației genetice din ADN procariot nu corespunde unor molecule ARN informaționale (ARNm), ci unora structurale (diferitele specii de ARNr 5S, 16S, 23S) sau funcționale (ARNt). Acumularea de observații a dus la elaborarea de către Jacob și Monod (1961) a modelului operonului, validat pentru numeroase sisteme enzimactice bacteriene (operon *lac*, *his*, *gal*, *ara* etc.). Acesta presupune existența unui grup de gene structurale, înrudite funcțional, dispuse în tandem pe cromozom și acționând coordonat de la aceleași regiuni reglatoare. Ca urmare, se transcrie un ARN policistronic, tradus continuu la ribozomi. S-a stabilit că sinteza enzimelor bacteriene se află sub dublu control genetic, condiționând specificitatea lor, cantitatea în care sunt produse și momentul în care trebuie sintetizate.

Principalele caracteristici ale operonilor sunt prezentate în continuare. Structura moleculară a unei proteine este determinată de elemente specifice, denumite *gene structurale*. Se formează *transcriptul*, proces replicativ secvențial, care poate fi inițiat numai în anumite puncte ale moleculei ADN. Mesagerul este o moleculă relativ instabilă de ARN, hidrolizată în cursul transferului de informație. Rata sintezei ARNm controlează rata sintezei polipeptidelor. Pentru ca o genă structurală să poată fi exprimată, adică să condiționeze biosinteza unui polipeptid, ea are nevoie de existența unor elemente specifice de reglaj, aranjate de obicei în amonte de gena propriu-zisă. Astfel, în structura operonilor (genelor) se deosebesc mai multe regiuni esențiale pentru fluxul de informație (fig. 1):

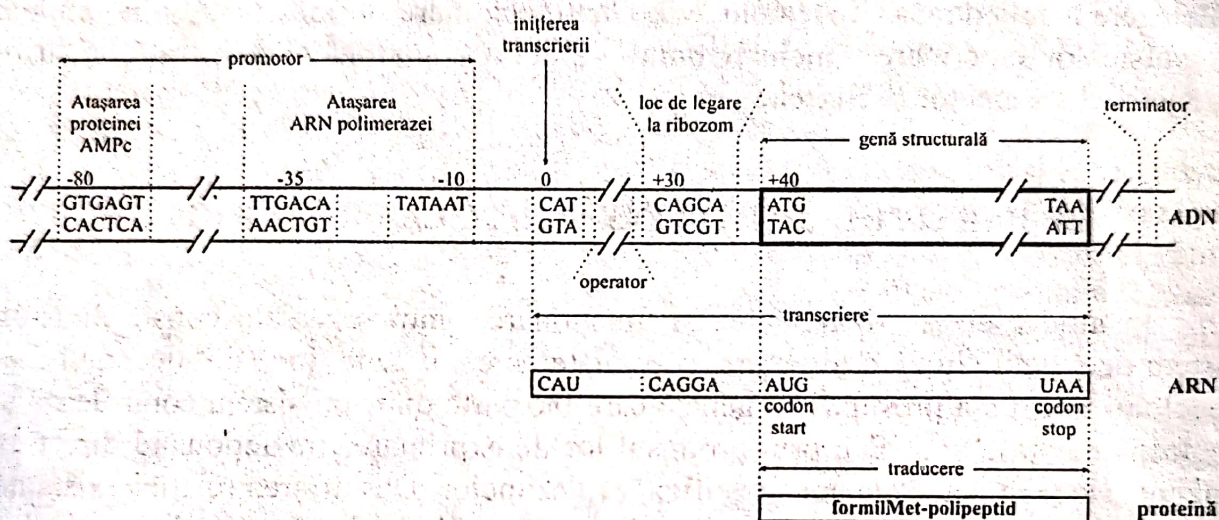


Fig. 1 – Structura și exprimarea genelor procariote.

– *promotorul* – zona de legare a ARN polimerazei-ADN dependente, în vederea transcrierii, include o porțiune de circa 80 pb; deși au fost descifrate secvențele nucleotidice pentru mai mulți promotori, nu s-a dat o definiție concisă și universală, deoarece s-a observat o omologie relativ slabă între ele, cu predominanța a numeroase perechi de baze A:T. În interiorul zonei promotorului au fost identificate trei regiuni funcționale distincte: prima condiționează legarea directă a polimerazei la următoarele secvențe din promotor. A doua regiune este situată cu circa 35 de baze înaintea locului de începere a transcrierii (poziția -35). În sfârșit, a treia regiune asigură legarea puternică a ARN polimerazei. Fiecare genă structurală are propriul promotor, la nivelul căruia au fost identificate unele secvențe identice, cum ar fi cutia Pribnow (...TATPuATG...), unde Pu este orice purină, fie A, fie G, aflată la poziția -10. Lângă promotor se află semnalul propriu-zis de inițiere a sintezei ARNm, cel mai frecvent fiind codonul TAC (transcris ATG);

– *operatorul* – zona de legare a proteinei represor, conține o regiune de circa 20 pb de care se atașează represorul (proteină specifică ce reglează „închiderea”/„deschiderea” funcționării genei, adică legarea ARN polimerazei); analiza operatorului genei *lac* a arătat că secvențele bazelor sale sunt centrate în jurul poziției +11 de la începutul transcrierii și că cele 21 pb ale sale au o structură

marcată de o dublă axă de simetrie. De asemenea, s-a remarcat existența unei slabe suprapunerii a regiunii operatorului peste cea a promotorului, ceea ce subliniază faptul că delimitarea celor două regiuni nu este deosebit de strictă, după cum ar reieși din schema prezentată;

– *terminatorul* – regiune a cărei secvență și structură secundară determină desprinderea ARN polimerazei; analiza secvenței nucleotidelor din zona de terminare a pus în evidență prezența unor triplete specifice (non-sens: TAG - *amber*, TGA - *ochre*, TAA, cu rol în terminarea sintezei polipeptidului codificat). Deși nu există o definiție universală a terminatorului la nivel de nucleotide, în ARN s-a constatat prezența unor regiuni homopolimerice de tip ...AAAAA... sau a unor secvențe ...AATAA, iar în ADN au fost puse în evidență structuri specifice „în ac de păr”, implicate în terminarea transcrierii;

– în amonte de promotor, se află regiunea *represor*, al cărei produs de exprimare controlează prin legare/disociere transcrierea genelor din aval. Genele reglatoare, între care și represorul, nu contribuie cu informații structurale noi la sinteza proteinelor pe care le controlează, ci doar decid dacă respectivele molecule se sintetizează sau nu la momentul dat, adică practic hotărăsc funcționarea genelor structurale.

În sistemele de enzime inductibile, represorul tinde să se combine specific cu unele molecule mici, astfel încât nu mai are afinitate pentru operator, ceea ce are drept rezultat activarea operonului. În sistemele care determină sinteza enzimelor represabile, represorul însuși este inactiv, fără afinitate pentru operator. Prin combinarea cu metaboliți specifici, el se activează, adică devine capabil să se atașeze de operator, blocându-i funcția. Moleculele mici care interacționează cu represorul au fost denumite *inductori* și *corepresori*.

Deci, genele structurale determină organizarea (structura) moleculară a proteinei, iar alți determinanți (genele reglatoare) controlează rata sintezei proteinelor prin intermediul represorilor, care pot fi inactivați de inductori sau activați de corepresori.

Pe baza unor observații experimentale, Shine și Dalgarno (1974) au emis ipoteza conform căreia nucleotidele terminale ale ARNr 16S au un rol esențial în legarea ARNm la subunitatea ribozomală 30S. Descifrarea structurii primare a capătului 3' al ARNr 16S (5'...AUCACCUCCUA_{OH}), precum și a locului de legare la ribozom a diferiților ARNm a sugerat că interacțiunea ARNm-ARNr este esențială pentru procesul de recunoaștere, ea determinând ca traducerea să înceapă exact de la codonul de start AUG. Ribozomul selecționează locul corect de legare pe seama interacțiunii dintre nucleotidele de la capătul 3' al ARNr 16S și o secvență scurtă, complementară din ARNm, de la capătul 5', din apropierea codonului de inițiere (secvențe de tip ...TCTTCTG..., ...CTTCC..., ...CCTTCC... – numite secvențe Shine-Dalgarno).

1.2. PARTICULARITĂȚI ÎNTÂLNITE LA EUCARIOTE

Din punct de vedere al transcrierii, al translației și al organizării genelor, între organismele procariote și cele eucariote există numeroase diferențe, astfel încât aserțiunea lui Monod (1961), care apreciasse că „ceea ce este adevărat pentru bacterie, este adevărat și pentru elefant”, nu este valabilă. Pentru procariote, modelul descris de Jacob și Monod (1961) este practic unanim acceptat și astăzi. Diferențele între celulele procariote și eucariote nu sunt doar de natură morfologică – absența sau prezența unui nucleu bine delimitat de o membrană, ci sunt marcate și de modul de organizare a informației la nivelul genomului. La eucariote, membrana nucleară acționează ca o barieră, separând informația genetică din genom/ cromozomi de citoplasmă.

În general, pentru decodificarea informației, procariotele și eucariotele folosesc mecanisme similare, dar – așa cum s-a menționat – există diferențe în structura celulară, precum și în dimensiunea și în organizarea genomului, ceea ce duce la deosebiri în ceea ce privește realizarea procesului. La eucariote, ARNm produs în nucleu și care corespunde unei singure proteine (are un singur codon de start și un singur codon de terminare) este obligat să străbată membrana nucleară pentru a participa la traducere în citoplasmă și, în plus, suferă procesarea capetelor.

De obicei, dimensiunea genomului sau cantitatea de ADN dintr-o celulă crește o dată cu complexitatea ei de evoluție. S-a calculat că genomul mamiferelor conține circa 10^{10} pb, ceea ce ar corespunde la circa 10^7 polipeptide medii, cifră exagerat de mare față de situația reală. A apărut întrebarea: ce rol funcțional poate avea cea mai mare parte a ADN și care este de fapt structura unei gene eucariote? Una dintre primele caracteristici importante ale ADN eucariot descifrate constă în existența secvențelor de baze repetate, repartizate de-a lungul genomului într-un mod anumit, cu similitudini remarcabile ale distribuției lor, ceea ce a permis ipoteza rolului lor ca elemente de reglaj al expresiei genice.

Semnificația secvențelor repetate, precum și particularitățile genelor eucariote au putut fi explicate o dată ce dezvoltarea tehnologiei ADN recombinat a oferit posibilitatea clonării diferitelor fragmente de ADN eucariot, iar tehnicile moderne au dus la descifrarea secvenței lor. S-a ajuns la concluzia că cele mai multe gene eucariote sunt discontinui, adică ele sunt organizate astfel încât secvențele care codifică un produs final sunt separate de secvențele non-codificatoare, nefiind regăsite în produsul final de exprimare.

Primele observații experimentale care au pledat în favoarea acestei imagini surprinzătoare a genelor eucariote s-au petrecut aproape simultan în diverse laboratoare. Situația de la eucariote a impus introducerea unei terminologii adecvate: porțiunile de gene care se exprimă au fost denumite *exoni*, cele care nu se exprimă au primit denumirea de *introni*, iar procesul de eliminare a secvențelor corespunzătoare intronilor se numește *splicing*. Splicingul are loc în nucleu, după modificarea capetelor ARN pre-mesager prin 5'-capping și prin 3'-poliadenilare,

cea ce face ca în acest organit celular să se găsească un număr mare de molecule ARN, cu o largă dispersie dimensională, denumit ARN nuclear eterogen. Toate moleculele ARNm de origine animală, care ajung în citoplasmă și apoi la ribozomi în vederea traducerii la proteinele corespunzătoare, sunt monocistronice. Demonstrarea discontinuității majorității genelor eucariote a fost realizată prin hibridizarea ADN genomic cu sonde reprezentate de către ARNm matur și vizualizare la microscopul electronic. De obicei, regiunile 5'-cap și 3'-poliA ale preARNm se regăsesc în ARNm matur, numărul exonilor fiind cu unul mai mare decât cel al intronilor; rareori, există paritate între introni și exoni, ceea ce are drept urmare pierderea inclusiv a semnalului de poliadenilare. În final, din transcriptul primar rămâne o porțiune de 50–90%. De exemplu, gena ovalbuminei de găină este compusă din opt exoni și șapte introni (Kourilsky și Chambon, 1978); gena lanțului β -globinei umane conține trei exoni și doi introni, iar gena catenei grele a imunoglobulinei de șoarece este formată din patru exoni și patru introni (Blanc, 1979).

Mecanismul procesului de splicing implică o bogată baterie enzimatică, incluzând endonucleaze, ARN-ligaze etc. După transcriere, intronii sunt îndepărtați pe parcursul a două etape:

- în prima etapă, ARN polimeraza-ADN dependentă transcrie întregul mesaj genetic existent în genă, cu sinteza unui ARN pre-mesager, adică un precursor de ARNm, care conține atât copia exonilor, cât și pe cea a intronilor;

- în cea de a doua etapă, ARN pre-mesager este supus – tot în nucleu – unei operații de excizie și îmbinare (*splicing*, adică „matisare”), ceea ce duce la pierderea regiunilor corespunzătoare intronilor; scindarea enzimatică specifică are loc în dreptul zonei de demarcație exoni-introni, urmată de îmbinarea exonilor între ei, pentru a da naștere unui ARNm care conține mesajul genetic continuu (fig. 2).

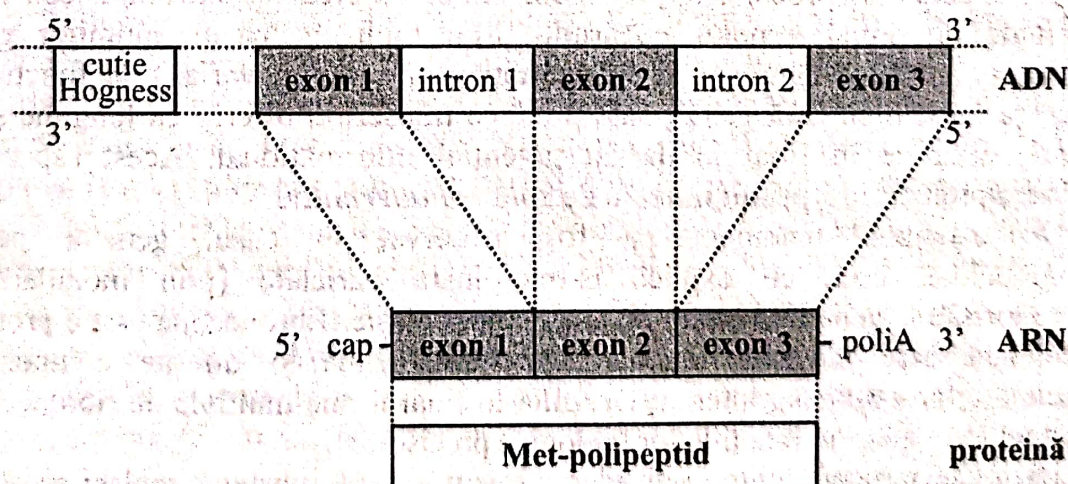


Fig. 2 – Structura și exprimarea genelor eucariote.

Studii de secvență a zonelor implicate au arătat existența la capetele intronilor a unor motive scurte, cu un ridicat grad de conservare. La nivelul situsurilor de splicing au fost puse în evidență trei clase de secvențe ADN, dar pentru

organismele superioare (pui, șoarece, iepure, virusuri murine etc.) secvențele cel mai des întâlnite par a corespunde unei cerințe generale: intronii încep cu GU și se termină cu AG (așa-numita *regulă a lui Chambon*) (tabelul 2).

Tabelul 2

Secvențe nucleotidice la capetele 3' ale intronilor

β-globină/intron 1	...GCAGGUUG---	---UCAGGCUG...
β-globină/intron 2	...CAGGGUGA---	---ACAGGCUG...
ovalbumină/intron 2	...UAAGGUGA---	---ACAGGUUG...
ovalbumină/intron 4	...GCCAGUAA---	---ACAGGAGA...
ovalbumină/intron 6	...UGAGGUAU---	---CCAGCAAG...

În mod sigur, simpla prezență a acestor nucleotide este insuficientă pentru excluderea intronilor, dar este necesară.

În ceea ce privește rolul intronilor, pornind de la preceptul că „natura nu face nimic inutil”, Tonegawa și colab. (1978) au arătat că – în cazul genelor pentru imunoglobuline – intronii sunt riguros intercalați între exonii care codifică părți moleculare polipeptidice, având fiecare funcții bine definite în cadrul moleculelor respective. Astfel, s-a sugerat că diferiții exoni ai lanțului greu al imunoglobulinei iau naștere printr-o serie de duplicări ale unei gene primordiale, prin care se realizează așezarea în tandem a noilor copii de exoni, iar intronilor le-ar reveni rolul de a racorda exonii între ei. De asemenea, s-a susținut ideea că intronii joacă un rol important în evoluția speciilor, facilitând fuzionarea secvențelor de ADN fără deranjarea mesajului genetic al exonilor. Existența intronilor ar determina îmbogățirea patrimoniului ereditar cu noi unități, capabile să codifice proteine noi. Prin urmare, organizarea genelor organismelor superioare este mult mai complexă decât cea a celulelor procariote, presupunându-se că prezența intronilor conferă o flexibilitate deosebită genelor eucariote. Mai mult, în cazul anumitor gene, combinația intronilor care vor fi îndepărtați prin *splicing* variază în funcție de celulă, așa încât o singură genă poate produce transcripți diferiți ca lungime și ca secvență, ceea ce în final le dă alt potențial informațional. Acest aspect de transcriere/prelucrare a primit numele de *splicing alternativ*.

De exemplu, fenomenul a fost observat în cazul genelor pentru imunoglobuline, ceea ce explică extraordinara varietate (prin modulare) a anticorpilor sau la gena fibronectinei, un exemplu clasic (fibronectina este o proteină extracelulară care mediază interacțiunea între celulă și diferite componente extracelulare; prin *splicing* alternativ rezultă în final forme multiple de fibronectină, care diferă între ele prin funcțiile lor biologice precise).

La unele virusuri (cum ar fi adenovirusurile) s-a constatat același aspect al *splicing*ului. Prin studii de microscopie electronică și hibridizare, în cazul transcrierii genomului adenoviral (format din 35 000 pb și divizat într-o sută de „unități” – numerotate de la stânga spre dreapta) s-a pus în evidență un proces deosebit: genele timpurii (*early*) se află răspândite în diverse regiuni, de unde se transcriu spre dreapta (localizare în unități de hartă genomică 1,5→11,5; 76→86)

sau spre stânga (16→92), deși la unele transcrierea are loc în sens invers (11←15). S-a constatat că unele regiuni timpurii se suprapun aproape 85% peste zonele cu transcriere târzie. Cea mai mare parte a moleculelor de ARNm hibridizează cu zona 51,7→61,3 a genomului, cu formarea unui ansamblu neobișnuit de trei bucle, care apoi pot fi prelucrate/îndepărtate așa încât să dea naștere unor informații ARNm „suprapuse”, cu secvențe 3' identice, dar cu zone 5' conținând secvențe adiționale. În acest mod, numărul total al speciilor ARN este superior numărului de proteine identificate în zona genelor târzii.

Procesul de splicing alternativ se dovedește economic pentru organism, deoarece generează variante specifice ale aceleiași proteine folosind o genă unică. În general, mesajul de la nivelul unui exon este responsabil pentru funcții bine definite.

În ceea ce privește proteinele multifuncționale cu rol catalitic, s-a considerat că ele sunt probabil sintetizate de către o singură genă. Aceste enzime, care catalizează reacții secvențiale sau asemănătoare, sunt organizate sub forma unor complexe multienzimatic, care asigură implicit controlul alosteric al mai multor activități. Complexul enzimatic a fost pus în evidență în celulele eucariote și poate fi constituit fie din diferite proteine monofuncționale, legate între ele prin interacțiuni necovalente, fie dintr-o singură unitate proteică prezentând activități enzimatic multiple.

La eucariote, reglarea expresiei genice are loc la diferite nivele:

a. *cromatinian*: la un moment dat, anumite gene se află într-o conformație specială, care le face apte pentru transcriere, inclusiv în funcție de gradul lor de metilare al bazelor CG (adică la așa-numitul nivel epigenetic, care reglează expresia activității genei, fără alterarea informației);

b. *transcripțional* (circa 80–90% din controlul exprimării are loc la acest nivel): ARNm eucariot matur este prelucrat prin 3'-poliadenilare (atașarea unei secvențe de 100–200 rezidii de adenină) și prin adăugarea structurii 5'-cap (N-metilguanozintrifosfat). Particularitatea capătului 3'poliA este speculată de tehnicile de izolare și purificare a ARNm eucarioti. Se pare că aceste prelucrări posttranscripționale au menirea de a proteja mesagerii contra unei degradări premature și/sau de a se constitui în semnale de recunoaștere pentru traducere. Reglarea la nivel transcripțional presupune și interacțiunea secvențelor nucleotidice cu diverși factori proteici nucleari, care modulează legarea și activitatea ARN polimerazelor-ADN dependente.

În celulele eucariote, la transcriere pot participa trei ARN polimeraze diferite, în funcție de tipul de ARN implicat. Astfel, ARNm este sintetizat de către ARN polimeraza II, ajutată de o serie de factori proteici. Aceștia recunosc un semnal scurt, consens (5–10 nucleotide, relativ bine conservate în diverse gene), aflat adiacent sau în interiorul genei respective, esențial pentru legare. ARN structurali sunt transcriși sub acțiunea ARN polimerazelor I și III.

O caracteristică a majorității moleculelor de ARNm eucariot constă în prezența – în transcriptii primari – a unor secvențe de intercalare, aflate între porțiunile de gene transcrise în ARNm și care ulterior dau naștere la proteine specifice. În consecință, conceptul de bază al coliniarității unei gene cu produsul

polipeptidic pe care îl controlează, extins la situația că secvența nucleotidelor pentru orice genă trebuie să fie continuă, a rămas valabilă doar pentru procariote (Flavell și colab., 1978).

Viteza procesului de transcriere este influențată prin transactivarea genelor, sub acțiunea unor factori reglatori denumiți factori *trans*. Aceștia prezintă mai multe domenii de interes, corespunzătoare locului de fixare la ADN. Procesul este deosebit de complex, la om fiind luate în considerare circa 1 000 de proteine nucleare reglatoare! Secvențele cu care interacționează acești factori pot avea diferite localizări față de gena pe care o controlează: 5' (în amonte față de promotor), 3' (în aval față de coada poliA), în interiorul intronilor sau la mare distanță de promotor (cum ar fi secvențele stimulative *enhancer* de 5–20 kb sau secvențele inhibitoare *silencer*).

Factorii *cis* corespund la câteva tipuri de structuri proteice, cunoscute ca: „deget de mână”, helix-bucă-helix, helix-„cot”-helix, fermoar (*zip*) de leucină. Conform conceptelor moderne, un factor *cis* se leagă la diferite secvențe *trans*, după cum și la o secvență *trans* se pot lega diferiți factori *cis*, majoritatea lor având o expresie nespecifică; de asemenea, trebuie menționat că nici un factor nu are un rol exclusiv. Simultan, în cursul transcrierii, la promotor se fixează 100–150 de molecule proteice, în ordinea ierarhică a importanței lor, ceea ce presupune apariția unei structuri complexe. La rândul lor, factorii de transcriere trebuie și ei activați, prin fosforilare, la nivelul unui anumit rest de serină, sau prin proteoliză, cu pierderea a 6–10 aminoacizi;

c. post-transcripțional: în funcție de timpul de viață a diferitelor specii de ARNm;

d. translațional: uneori poate avea loc un *splicing* alternativ, ceea ce va avea drept rezultat exprimarea mai multor polipeptide din același cadru de citire (*open reading frame* ORF – regiune a secvenței ADN care nu conține nici unul dintre cei trei codoni stop și care are potențial de codificare pentru o proteină);

e. post-translațional: prin prelucrarea (glicozilarea sau acetilarea) polipeptidelor sintetizate.

La eucariote un ARNm duce la sinteza unui singur polipeptid, așa încât tipul de operon de la procariote nu poate fi întâlnit în genoamele organismelor superioare. În plus, ADN eucariot, în structura căruia se găsesc numeroase secvențe repetitive (în tandem sau izolate), este complexat cu proteine bazice de tip histonic sau non-histonic, cu care formează cromatina. De exemplu, nucleul fiecărei celule diploide umane conține circa 7 pg ADN, de circa 6×10^9 pb (pe când conținutul unei celule bacteriene este de numai 0,003 pg ADN!!!), având o lungime de aproximativ 2 m, cuprins într-un nucleu de numai 10 μ m în diametru, ceea ce implică un grad înalt de împachetare a moleculei de ADN. La vertebrate sunt cunoscute 5 tipuri de histone, desemnate H1, H2A, H2B, H3, H4. Unitatea de bază este *nucleozomul*, un octamer format din molecule histonice H2A, H2B, H3, H4 și 146 pb din ADN, formând o structură cu aspect discoidal. Între nucleozomi se

găsesc zone libere de histone, cu o lungime de circa 50 pb, la care se leagă doar o singură moleculă H1. În celulele aflate în repaus transcripțional apare un nivel superior de împachetare, constând în formarea unui solenoid, o structură în care nucleozomii sunt înfășurați în jurul unei baghete reprezentate de un multimer de histonă H1. Solenoidul are un diametru de 30 nm, fiecare tur conținând șase nucleozomi și șase molecule H1.

Condensarea cromozomilor are rolul său în represia expresiei genice, probabil prin blocarea accesului factorilor necesari procesului. Structura cromatinei poate fi apreciată prin sensibilitatea ei la enzime endonucleolitice (DNaze), întrucât formarea solenoidului este un mod de protejare a informației. Mai mult, genele active sunt susceptibile la atacul enzimatic, pe când cele „tăcute” sunt relativ rezistente.

Genele eucariote corespunzătoare unei anumite căi metabolice sunt grupate în familii de gene aranjate în tandem (cunoscute sub denumirea de *cluster*), a căror activitate este – de obicei, dar nu întotdeauna – corelată. Un exemplu concludent îl constituie genele pentru histone (familie multigenică simplă) sau cele pentru α -globină (familie multigenică complexă, controlată în dezvoltare) (fig. 3).

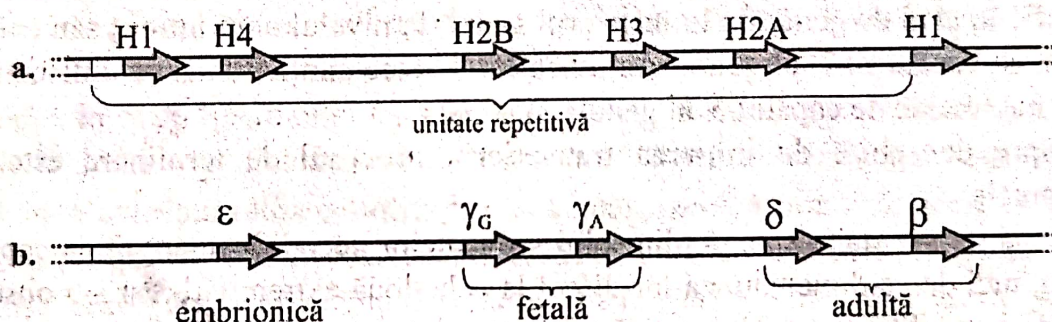


Fig. 3 – Clustere de gene (exemple: a. genele pentru histone; b. genele pentru α -globină).

Începutul și sfârșitul unei gene structurale eucariote sunt precizate, la fel ca și la procariote, de unele secvențe semnal, recunoscute de către proteine specifice, responsabile de exprimarea genei. Secvențele respective au fost mai puțin bine precizate comparativ cu cele de la procariote, dar s-a conturat un model general de organizare a genei eucariote. Există:

– *promotorul* – secvență ADN situată la capătul 5' al unității de transcriere. Studiul mai multor gene eucariote a arătat că regiunea promotorilor este marcată de prezența *cutiei Hogness* sau *cutia TATA* (analoagă cutiei Pribnow din zona promotorilor procarioti), aflată cu circa 30 de nucleotide în amonte de gena structurală și a cărei structură completă este 5'-TATAA(T)-3';

– *cutia CAT* – este o secvență GC(T/A)CAATCT, situată cu circa 80 de nucleotide înaintea locului de începere a transcrierii genei eucariote;

– *secvențele conducătoare (leader)* – sunt definite ca secvențe netraduse, care codifică capătul 5' al ARNm matur, situate în amonte de secvența codonului de start AUG, având lungime variabilă (10–380 pb, majoritatea 40–80 pb). Această

regiune pare să fie implicată în atașarea la subunitatea ribozomală 40S; oricum, inițial se leagă la/lângă capătul 5'-cap al ARNm, iar apoi migrează de-a lungul catenei până la codonul AUG. Totuși, spre deosebire de procariote, nu s-a decelat un situs clar de legare la ribozom, dar s-a observat că deseori, în amonte de codonul de start, există o secvență slab conservată, denumită *secvența Kozak*, necesară asigurării unei traduceri optime;

- *structura 5'-cap* – este o caracteristică a celor mai mulți ARNm eucarioti și constă dintr-o guanină 7-metilată, atașată printr-o legătură 5',5'-pirofosfat la o a doua bază metilată. Apare în urma prelucrării posttranscripționale a ARNm;

- *secvența poliA* – cele mai multe gene eucariote au la capătul 3' o secvență de tip AATAA, care ar reprezenta semnalul de poliadenilare. Această secvență apare în ARNm sub forma AAUAA și este recunoscută de o endonuclează care scindează ARNm nascent cu 10–15 baze în aval și abia apoi ARNm este poliadenilat;

- *elemente de eficientizare* – situsuri la care se pot lega unii factori de transcriere, care determină frecvența de inițiere a acestui proces. Legarea lor poate avea loc la distanțe de zeci sau sute de nucleotide departe de genă. Între aceste elemente un rol deosebit îl au *enhancerii* (elemente de intensificare a transcrierii), situați fie în aval de genă, fie în interiorul genei (la nivelul unui intron) sau chiar în apropierea capătului 3' al genei. Acțiunea lor se face simțită chiar la o distanță de mii de nucleotide de capătul 5' al genei.

Spre deosebire de inițierea transcrierii, procesul de terminare este mai puțin precis.

Încă nu s-a stabilit pe deplin rolul secvențelor necodificatoare de la capetele ARNm, nici de ce dimensiunea lor diferă la cele două extremități, dar s-a observat că deseori stabilitatea citoplasmatică și eficiența traducerii depind de aceste regiuni din structura mesagerului.

1.3. EXPRIMAREA GENELOR EUCARIOTE ÎN SISTEM PROCARIOT

Introducerea unei gene străine într-o celulă procariotă sau eucariotă în scopul exprimării ei nu se face aleatoriu. Gena trebuie să fie astfel amplasată în noul sistem încât să aibă orientarea corectă, adică ordinea nucleotidelor sale să se succedă în sensul în care se face transcrierea (spre dreapta sau spre stânga) de către aparatul de transcriere al gazdei, sub al cărei control trebuie să se afle, cu alte cuvinte să fie „în fază”. De asemenea, este obligatoriu ca gena heteroloagă să conțină semnalele specifice de inițiere și de terminare a biosintezei proteinei pe care o codifică. Pentru ca genele să fie funcționale, adică să fie capabile să se exprime atunci când – prin tehnologia ADN recombinat –

sunt introduse într-un sistem bacterian adecvat sau într-un sistem eucariot de tip diferit, ele trebuie să conțină semnalele adecvate în poziția corectă. În mecanismele de exprimare genică intervin o serie de parametri care guvernează sinteza proteinei codificate, cum ar fi:

- numărul de gene corespunzătoare unui anumit produs, care – la rândul lor – condiționează numărul moleculelor ARNm;

- eficiența promotorilor – fiecare genă are promotorul ei specific, dar atașarea ARN polimerazei-ADN dependente nu se face în mod uniform. În acest context, tehnologia ADN recombinat oferă posibilitatea plasării genei sub controlul unui promotor puternic, fie cel specific (eventual modificat printr-o mutație punctiformă, care să asigure o transcriere eficientă), fie unul diferit sau chiar mai mulți promotori (aflați – la rândul lor – sub controlul celui mai activ);

- stabilitatea și structura terțiară a mesagerului genei de interes.

Există factori care:

- condiționează legarea ARNm la ribozom, etapă principală în inițierea sintezei proteice. În sistem procariot aceasta depinde de locul în care a fost inserată gena structurală de interes în raport cu elementele genetice care controlează transcrierea și traducerea unui operon al gazdei. Pentru exprimarea genelor străine au fost utilizate regiunile de control ale operonilor *lac* sau *trpE* din *E.coli*. De exemplu, în cazul operonului *lac* elementele esențiale sunt: promotorul, operatorul, locul de inițiere a sintezei ARNm, locul de atașare la ribozom, secvența de nucleotide corespunzătoare sintezei β -galactozidazei. În practică, aceste elemente se izolează (sau – unele – se sintetizează) și apoi se cuplează cu gena străină. Produsul recombinat obținut se introduce într-un sistem bacterian adecvat pentru a fi exprimat. Dacă elementele operonului *lac* ar fi cuplate cu gena insulinei, în bacteria transformată cu această moleculă ADN hibridă va fi sintetizată o proteină de fuziune, conținând o parte din molecula de β -galactozidază, legată la unul din lanțurile polipeptidice ale insulinei;

- condiționează stabilitatea produsului final. În majoritatea cazurilor, produsul sintetizat într-o celulă pe baza mesajului alogenei rămâne stabil în noul mediu celular, însă uneori se impun anumite modificări, în vederea creșterii stabilității sale. De exemplu, se poate recurge la introducerea unor gene de rezistență la temperaturi ridicate: *Bacillus subtilis* este frecvent utilizat pentru sinteza α -amilazei, care nu rezistă la 60°–70°C; dacă în această bacterie se „grefează” gena α -amilazei, dintr-o termobacterie, va rezulta o enzimă termorezistentă, ca urmare fermentația de producere va putea avea loc la temperatură mai ridicată, ceea ce facilitează și purificarea produsului de interes.

Exprimarea genelor străine introduse prin tehnologia ADN recombinat în celulele bacteriene depinde de existența secvențelor de legare la ribozom.

Un alt aspect al relației genă-proteină îl constituie posibilitatea exprimării unor gene eucariote în sistem procariot. Dacă este vorba de holoproteine, exprimarea genelor eucariote în celulele procariote nu ridică probleme deosebite, dar dacă gena de exprimat aparține unor heteroproteine – cum ar fi de exemplu, glicoproteinele, produsul final nu corespunde, deoarece în bacterii nu există sistemele enzimatice necesare procesării prin glicozilare sau acetilare, care au loc după atașarea polizomilor la membrana reticulului endoplasmatic, așa încât în acest caz este de dorit ca exprimarea să aibă loc tot în sistem eucariot.

TRANSFERUL DE INFORMAȚIE GENETICĂ

Transferul de informație genetică între diverse organisme în cadrul aceleiași specii sau între specii (foarte) înrudite se poate produce în mod natural, spontan sau poate fi dirijat de către experimentator, prin procese în urma cărora rezultă generații de indivizi cu noi genotipuri.

De altfel, trebuie spus că în biologie, ca și în filosofie sau în logica mulțimilor, totul – adică întregul – nu este reductibil la suma părților componente. În această perspectivă, patrimoniul ereditar al unei ființe vii nu este doar o sumă de gene izolate. Practic, cercetătorul are acces la nivelul unui singur element din ansamblu, izolarea unei gene fiind un preambul necesar atât pentru studierea sa din punct de vedere tehnic, cât și pentru utilizarea într-un anumit scop. De fapt, în laborator nu sunt create noi specii, ci se realizează doar înzestrarea unei celule/unui organism cu una/mai multe informații genetice suplimentare.

2.1. TRANSFERUL DE INFORMAȚIE GENETICĂ LA PROCARIOTE

La procariote modificarea fenotipului se realizează prin: recombinare genetică, transformare bacteriană, conjugare, transducție, tehnologia ADN recombinat.

2.1.1. RECOMBINAREA GENETICĂ

Este un proces natural prin care se formează genotipuri noi, având la bază schimbul de material genetic între doi parentali care diferă prin una sau mai multe proprietăți ereditare; se desfășoară între tulpini foarte apropiate genetic, aproape intraspecific, în zona de omologie a materialului genetic și stă la baza variabilității. În general, este un proces spontan. Interschimbul între speciile neînrudite este limitat de către o serie de bariere macrostructurale sau de anumite incongruențe la nivelul materialului genetic, ceea ce determină incongruențe de structuri proteice.

Un exemplu de recombinare genetică ar putea fi următorul: o tulpină bacteriană incapabilă să utilizeze un anumit aminoacid din mediu (Met⁻) este

cocultivată cu o altă bacterie, incapabilă să metabolizeze lactoza (Lac^-). Pe parcursul apariției unor noi generații, un anumit număr de descendenți devin apti să metabolizeze ambele substraturi (fig. 4).

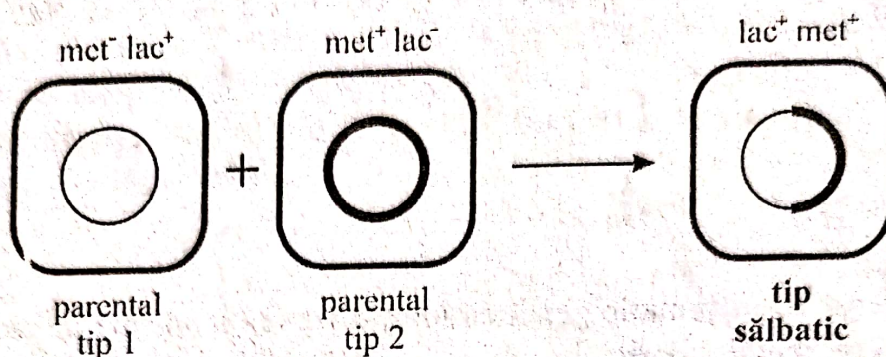


Fig. 4 – Recombinarea genetică la bacterii (exemplu).

2.1.2. TRANSFORMAREA

Constă în captarea de către celulele aflate în stare de competență (o stare specială a peretelui celulei bacteriene) a moleculelor de ADN străin, care va fi integrat sau nu în cromozomul celulei acceptoare, cu replicarea stabilă a segmentului respectiv, așa încât acesta să devină o componentă a patrimoniului genetic al celulei. Procesul poate avea loc accidental (v. recombinația genetică) sau artificial, ca în experiența lui Griffith (1928): acesta a amestecat un pneumococ *smooth* patogen S (cu polizaharide), inactivat termic, cu un pneumococ *rough* nepatogen R (deficitar în polizaharide), iar mixtura rezultată a fost inoculată la șoarece, care a făcut pneumonie. Explicația constă în transferul de informație între tulpini, astfel încât informația genetică neinactivată (nativă) din pneumococul R a fost încapsidată de către polizaharidele pneumococului S, restabilindu-se patogenicitatea (fig. 5).

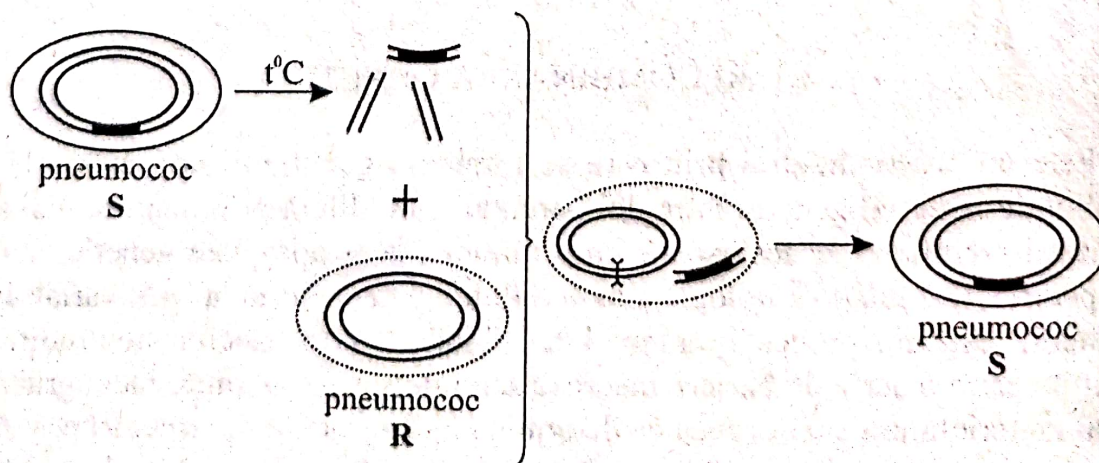


Fig. 5 – Experiența lui Griffith.

Avery și colab. (1944) au izolat ADN, dovedind neechivoc rolul lui în transferul de informație. Introducerea într-o celulă a unui material genetic străin presupune ca celula respectivă să fie în stare de competență; pentru realizarea acesteia, prin mijloace specifice, se induce tranzitoriu porii cu dimensiuni adecvate pentru realizarea transferului de acid nucleic. În mod natural, procesul are o eficiență foarte scăzută, dar în condiții de laborator captarea ADN străin poate fi mărită în mod artificial, prin tratarea bacteriei receptoare cu ioni Ca^{2+} , cu șocuri termice sau electrice, cu lipozomi. La unele bacterii starea de competență apare în fazele inițiale de creștere, la altele în faza exponențială. S-a dovedit că această stare se datorează unei anumite proteine de la suprafața celulei (întrucât spălarea cu apă a celulelor competente duce la obținerea de celule incompetente). Agentul de transformare trebuie să aibă o dimensiune optimă de 10^6Da , precum și o concentrație adecvată, care diferă cu tipul de celulă.

De multe ori, pe parcursul procesului de transformare apare o recombinare omoloagă (fig. 6), care la nivelul cromozomilor omologi se traduce prin *crossing-over*.

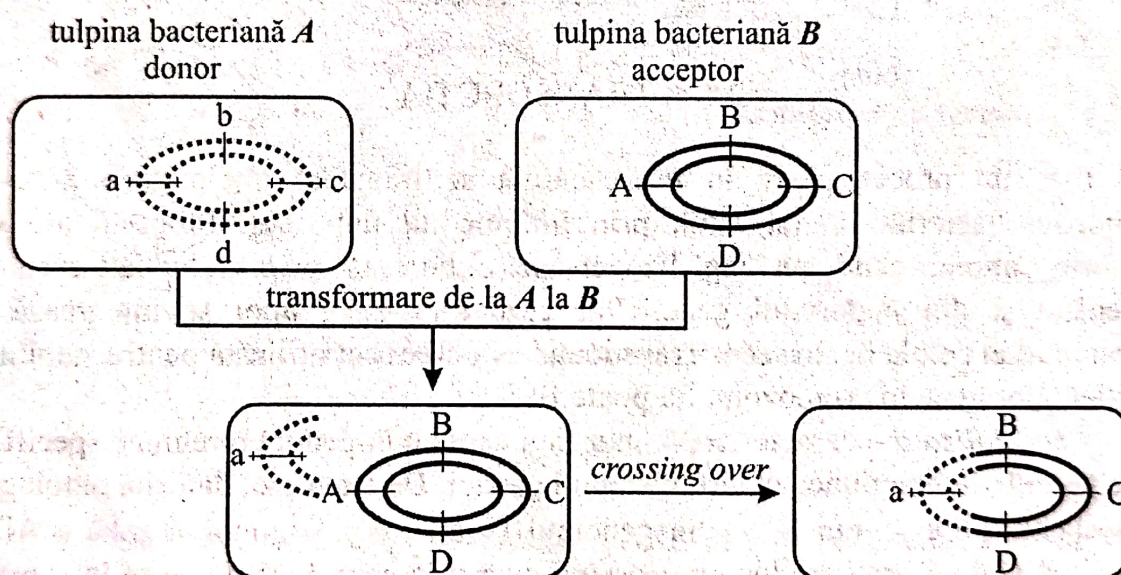


Fig. 6 – Procesul de transformare, însoțit de *crossing-over*.

2.1.3. CONJUGAREA

Descoperită de Lederberg și Tatum (1948), constă în transferul unui factor de fertilitate, care conferă caracterul de *donor*, de la celule masculine F^+ la celule *acceptoare*, feminine F^- . Acest factor a fost identificat a fi o moleculă de ADN circular, epizomal (cu replicare autonomă, independentă de ADN celular) sau cu replicare sincronă cu ADN celular (atunci când se află integrat la un situs specific din cromozom). Celulele F^+ prezintă pili, cu rol în apropierea celulelor și cu implicații în fuziunea lor. În populațiile F^+ există o categorie de celule cu înaltă frecvență de recombinare *Hfr* (*high frequency of recombination*), la care

factorul respectiv este integrat în cromozom. Genele transferate se manifestă după intervale îndelungate de timp. Agitarea culturii bacteriene în care are loc procesul de conjugare produce ruperea mecanică a punții de legare între celulele implicate, precum și a ADN care se transferă partenerului receptor (fig. 7), ceea ce a permis urmărirea procesului și realizarea unor hărți genetice, cu identificarea genelor transferate.

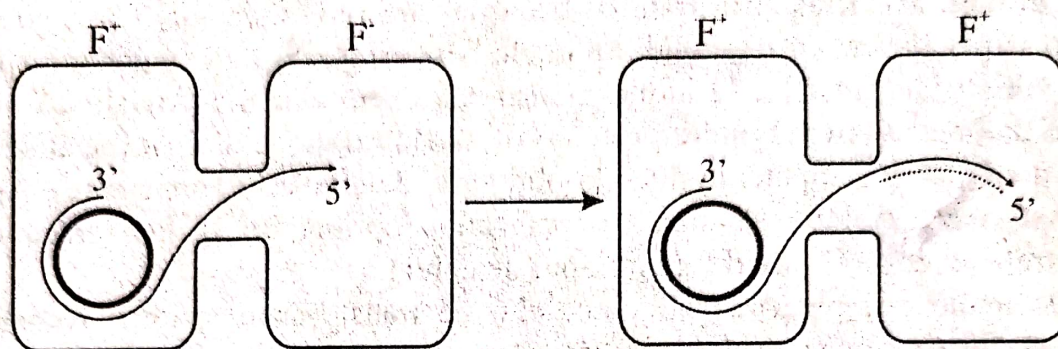


Fig. 7 – Conjugarea bacteriană.

2.1.4. TRANSDUCȚIA

Este un proces pasiv în urma căruia se transferă unele gene dintr-un cromozom bacterian la un altul, prin intermediul unui fag. Procesul are loc aleatoriu, atunci când un fag lizogen se eliberează prin inducție, eventual antrenând și din materialul genetic al gazdei (1–2%); apoi se integrează în genomul altei celule bacteriene. Transducția este frecvent utilizată pentru stabilirea poziției unor gene în cromozom. Ea poate fi:

- *specializată* – caracteristică unor fagi care au în genom o regiune specifică, ce le permite interacțiunea cu cromozomul gazdei. De exemplu, datorită omologiei de secvență între regiunea *att* din genomul fagului λ și o anumită zonă a ADN cromozomal de *E. coli* are loc un *crossing-over* prin care ADN fagic se integrează în genom. În anumite condiții, un factor fizico-chimic care intervine în cursul maturării (UV, temperatură, clorofom) poate produce excizia ADN fagic, posibil împreună cu una sau mai multe gene ale gazdei, pe care le poate transfera apoi unor noi celule infectate (fig. 8);

- *generalizată* – caracteristică fagilor care nu interacționează cu o regiune specifică din cromozomul bacterian, așa încât maturarea fagilor și atașarea în timp a unor gene din cromozomul gazdei în apropierea locului de integrare permite transferul oricăror gene. Se produce liza celulară, iar din lizat se pot izola fagii transductori;

- *abortivă* – după pătrunderea în celula-gazdă genomul fagic nu se mai multiplică, așa încât pe măsură ce are loc diviziunea celulară fagul se diluează și, odată cu el, genele pe care eventual le purta.

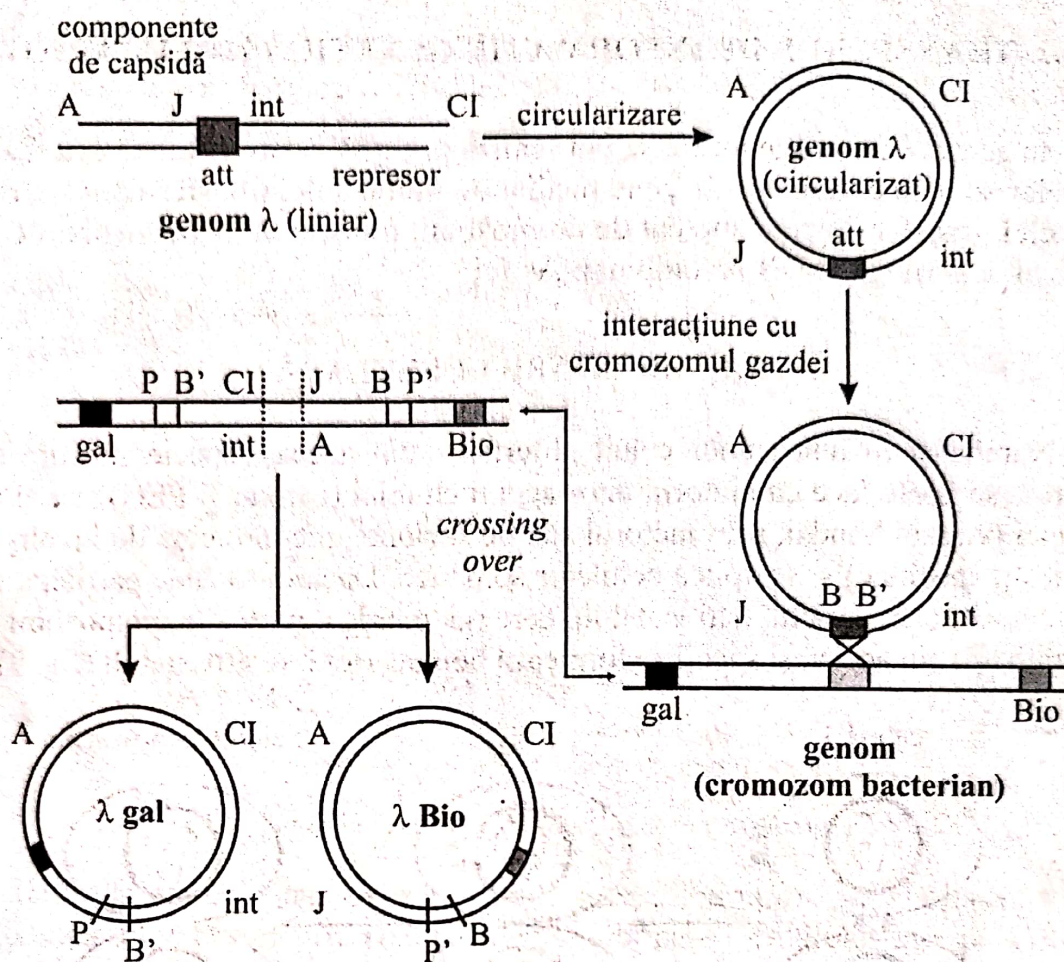


Fig. 8 – Schema transducției specializate.

2.1.5. TRANSFEȚIA

Are loc atunci când un acid nucleic – ARN sau ADN – izolat dintr-un virus infectează celule susceptibile, reproducând procesul de replicare virală în absența virionului.

2.1.6. TEHNOLOGIA ADN RECOMBINAT

Cuprinde totalitatea metodelor implicate în construirea unei molecule de ADN cu proprietăți neîntâlnite în natură, fie din fragmente de ADN provenind de la aceeași specie (dar aranjate diferit așa încât elementele genetice să aibă o altă organizare decât în ADN de origine), fie din fragmente de ADN provenind de la specii diferite. Ea permite atât studierea genomului, cât și sinteza unor polipeptide (proteine) sau poate fi folosită pentru analiză. Această tehnologie constituie de fapt obiectul acestui volum,

2.2. TRANSFERUL DE INFORMAȚIE GENETICĂ LA EUCARIOTE

În acest caz, transgenozele se pot realiza prin: hibridare celulară sau fuziunea celulelor somatice, transfer de gene mediat de minicelule, transfer de gene mediat de nucleu, transfer de gene mediat de cromozomi, transfer de gene mediat de ADN purificat, tehnologia ADN recombinat. Astfel:

2.2.1. HIBRIDAREA CELULARĂ

Numită și fuziunea unor celule diferite – din aceeași specie sau din specii diferite – se poate face cu ajutorul unor agenți chimici (cum ar fi PEG) sau al unora biologici (virusul Sendai, prin factorul său de fuziune, glicoproteina de înveliș F, cu proprietăți specifice) și se aplică celulelor somatice. Dacă la fuziune participă specii diferite apar heterocarioni, mai instabili, care pot pierde o parte din cromozomi; dacă parentalii aparțin aceleiași specii se formează homocarioni, relativ stabili (fig. 9).

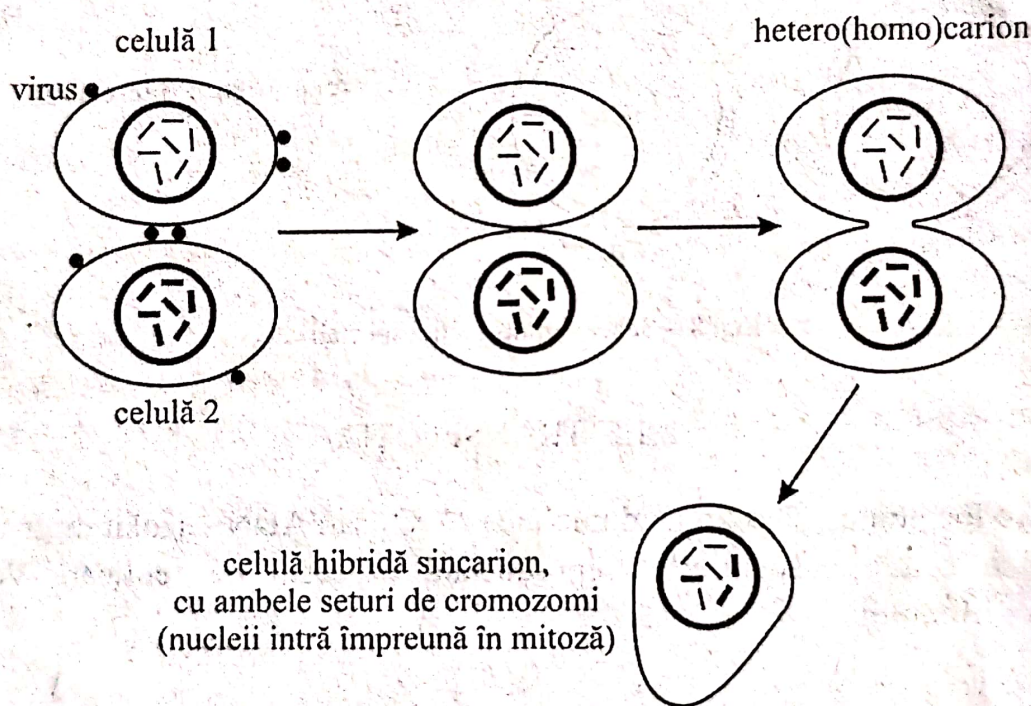


Fig. 9 – Schema hibridării celulare.

Selecția celulelor-hibride a fost mult facilitată de utilizarea unor celule cu deficiențe genetice specifice, urmărite ca marker. Un exemplu este prezentat în fig. 10.

La celulele bacteriene, la cele ale drojdiilor și ale plantelor, existența peretelui celular rigid ridică alte probleme, legate de disruperea acestuia cu ajutorul unor enzime adecvate, având drept rezultat expunerea citoplasmei. Celulele vegetale lipsite de perete, numite *protoplasti*, permit transformarea, precum și fuziunea celulară. Ca enzime se folosesc: lizozim (pentru bacterii), helicază de melc, zimoliază sau

β -glucuronidază (pentru drojdii) etc. La plantele superioare, fuzionarea protoplaștilor duce la apariția unei formațiuni hibride, numite *callus*, care poate apoi regenera planta întreagă, cu proprietăți mixte, dacă se lucrează cu două tipuri de protoplaști.

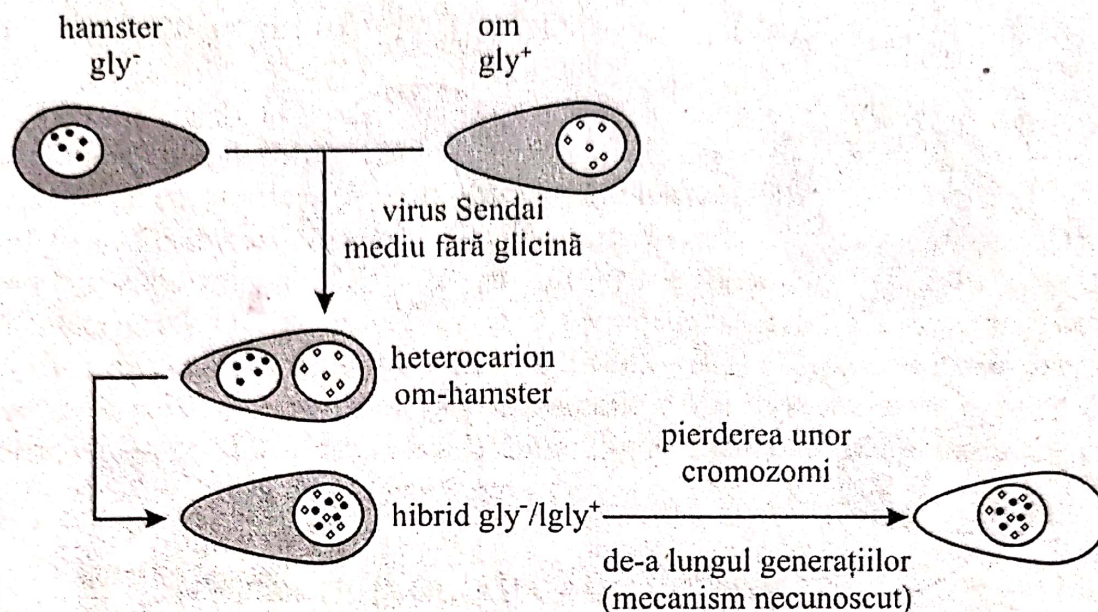


Fig. 10 – Selecția celulelor-hibride cu ajutorul markerilor genetici.

Hibridarea celulară permite, între altele, cartarea unor cromozomi sau reactivarea unor gene reprimite. Tehnica de obținere a celulelor-hibride a dobândit și aspecte practice deosebite, ea stând la baza producerii anticorpilor monoclonali cu ajutorul hibridoamelor, obținute din celule mielomatoase (cu capacitate nelimitată de diviziune) și celule producătoare de anticorpi (specializate).

2.2.2. MINICELULELE

Conțin doar o parte din informația genetică a celulelor parentale de proveniență, ca urmare a unor șocuri termice de la 4°C la 37°C, care probabil că modifică fusul mitotic. Cu ajutorul unor minicelule s-a reușit transferul unor cromozomi murini la celulele umane transformate HeLa sau cel al unor cromozomi umani la celulele murine. Utilizarea minicelulelor conferă însă o slabă eficiență de transfer de informație genetică parțială de la parentali.

2.2.3. TRANSFERUL DE GENE MEDIAT DE NUCLEI

Asigură prin tehnici de extremă finețe, de microinjecție, introducerea unor nuclei de celule somatice în citoplasma unui ou fertilizat. Procedul implică o modificare dramatică a organizării celulare, cu formarea unui sistem artificial, în care se creează noi raporturi nucleu-citoplasmă și celulă-mediu. În acest domeniu au devenit clasice lucrările lui Gurdon (1977) pe amfibieni: nucleii donori ai unei

specii de broască „neagră” au fost prelevați de la embrioni în stadii incipiente de dezvoltare (între blastulă și morulă), întrucât nucleii celulelor adulte s-au dovedit totuși improprii (fig. 11).

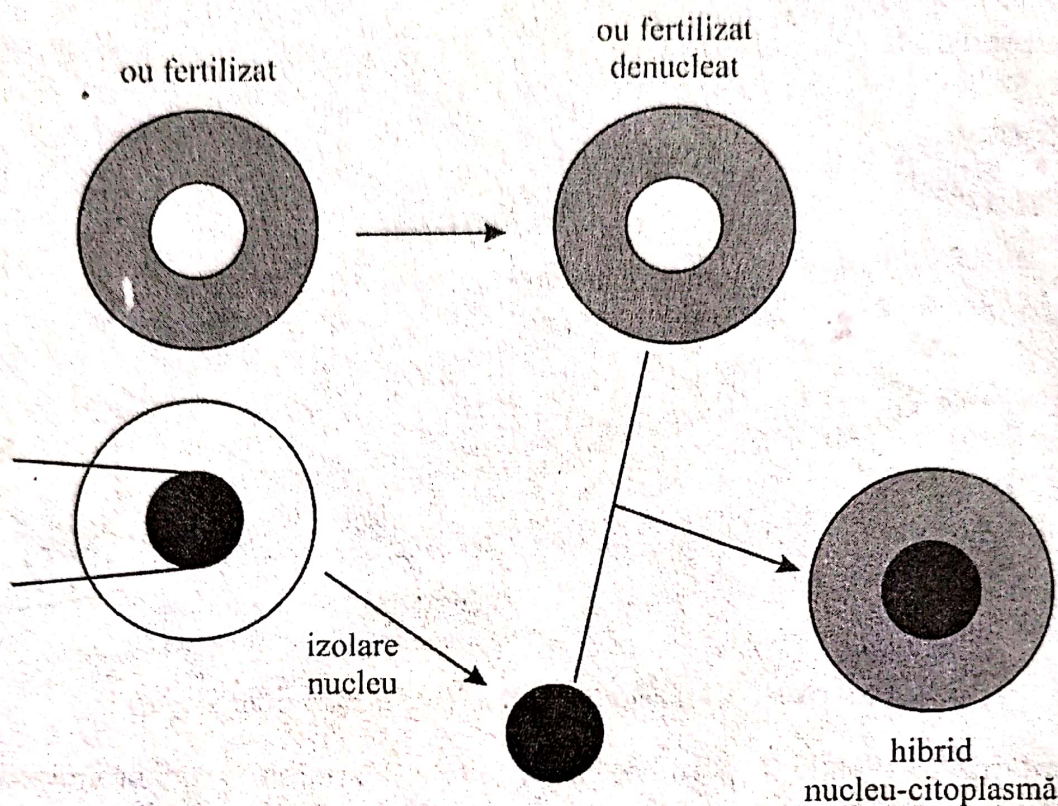


Fig. 11 – Experiența lui Gurdon.

Ouăle fertilizate care au fost denucleate au provenit de la o broască „albă”. Rezultatul transplantului de nucleu a fost apariția unei pleiade de broscuțe „negre”, „gemene”.

Ca aplicații, procedeul permite clonarea animalelor superioare, prin multiplicare asexuată; donori de nucleu pot fi exemplare de mare eficiență economică, iar ca acceptori pot fi folosite celule-ou de la exemplare oarecare. Procedeul de la amfibieni a fost „copiat” la șoarece, iar anul 1997 a dus la apariția unor clone de animale de interes, cum ar fi deja celebrele: oaia Dolly și capra Polly, iar foarte recent – porcul sau pisica.

2.2.4. TRANSFERUL DE GENE MEDIAT DE CROMOZOMI

Se realizează cu cromozomii izolați după fixarea celulelor în metafază (cu colchicină sau colcemid) și tratare cu un detergent neionic. Cromozomii astfel obținuți sunt amestecați cu o suspensie de celule acceptoare, iar cele care au primit informația străină sunt selecționate pe medii specifice. Celulele se numesc *transferente* sau *transfectante*. Eficiența redusă a procesului este de regulă asociată și cu o mare instabilitate a genei/genelor transferate. Utilizarea lipozomilor pentru

transferul cromozomilor permite îmbunătățirea relativă a performanțelor, dar procedeul nu este totuși de anvergură.

2.2.5. TRANSFERUL DE GENE MEDIAT DE ADN PURIFICAT

Avery și colab. (1944) au dovedit primii, la bacterii, posibilitatea transferului de informație cu ajutorul ADN purificat, procedeu denumit *transfecție*. Un exemplu, la eucariote, îl constituie transferul genei timidinkinazei virusului herpetic TK (cu rol în fosforilarea guaninei) la celulele murine L, deficiente în această enzimă. ADN din virusul herpetic, izolat și purificat, este hidrolizat enzimatic specific, așa încât să nu fie afectată gena TK, materialul servind apoi la transfecție. Ca urmare, celulelor L-TK⁻ le-a fost conferit genotipul TK⁺. Pe de altă parte, a ajuns deja clasic exemplul șoarecelui căruia i s-a transferat prin transfecție gena hormonului de creștere de la șobolan, iar șoricelul a crescut până la dimensiunea șobolanului (Palminster și colab., 1982) – adică a devenit un șoarece transgenic.

2.2.6. TEHNOLOGIA ADN RECOMBINAT

Acest procedeu artificial s-a dovedit a fi cel mai prolific din punct de vedere al transferului de gene. Principial nu există diferențe între aplicarea la organismele eucariote față de procariote și va constitui de fapt subiectul acestui volum, așa după cum s-a menționat și anterior.

2.3. SCHEMA GENERALĂ A TEHNOLOGIEI ADN RECOMBINAT (TRANSFERUL ARTIFICIAL DE GENE)

Modelul cel mai simplu de efectuare a transferului de informație genetică, adică de adevăr transmis cu semnificația umană de „mesaj”, este redat de schema tehnologiei ADN recombinat. Teoretic, parcurgând o astfel de schemă se poate obține orice combinație de material genetic își propune experimentatorul. Tehnologia presupune izolarea ADN, recombinația *in vitro* și reintroducerea în organismul (celula) viu. Și această tehnologie implică selecția genotipului dorit, dar probabilitatea succesului este mai mare cu câteva ordine de mărime față de tehnicile tradiționale.

Tehnica de bază este extrem de simplă: se izolează două tipuri de molecule de ADN din două surse diferite; acestea sunt apoi tăiate cu una sau mai multe enzime specializate, iar fragmentele de interes rezultate se reassemblează într-o combinație dorită, cu ajutorul enzimelor corespunzătoare de legare. Molecula hibridă se introduce în celule adecvate, pentru replicare, reproducere și – eventual – exprimare.

Interesul curent pentru ingineria genetică este suscitată de numeroasele sale aplicații practice, cum ar fi:

- izolarea unei anumite gene, a unei părți a genei sau a unei regiuni a genomului;
- producerea unui anumit ARNm și, deci, a proteinei corespunzătoare, în cantități mari care nu pot fi obținute altfel;
- îmbunătățirea producerii de polipeptide/proteine (enzime, medicamente);
- obținerea unei varietăți de plante cu caracteristici dorite (cu necesar redus de îngrășămintă sau cu rezistență la boli);
- corectarea unor defecte genice (genetice) la organismele superioare;
- crearea unor organisme cu importanță economică (de exemplu, plante cu maturizare mai rapidă sau cu randamente mai mari, animale producătoare de proteine umane etc.).

2.3.1. SCHEMA ÎNȚIALĂ

În 1979 Abelson a propus pentru tehnologia ADN recombinat următoarea schemă: un *vector* circular bicatenar este scindat de o enzimă de restricție la un ADN liniar cu capete coezive. Dintr-un alt genom, cu aceeași enzimă, se izolează gena de interes sau *pasagerul*. În prezența ADN ligazei, gena de interes se leagă de vectorul liniarizat, formându-se molecula de *ADN recombinat*, care în continuare va fi folosită pentru *transformare*. Urmează *clonarea* și *amplificarea* acestui ADN.

În prezent, schema s-a complicat datorită diversității moleculelor de ADN implicate.

Vectorul este o anumită moleculă de ADN autonomă față de cromozomul gazdei. Această moleculă este capabilă să „protejeze” o genă (element) străină, pe care o multiplică simultan cu propria entitate. Pentru aceasta vectorul trebuie să fie un *replicon* (Jacob, Brenner, Cuzin 1963), adică o moleculă capabilă de autoreplicare, conținând originea replicării și, eventual, o genă cu funcția de stimulator al procesului de replicare (codifică o proteină cu rol *enhancer*).

Molecula vectorului trebuie să fie relativ mică. Deseori, ADN folosiți ca vectori trebuie modificați, cu păstrarea elementelor strict necesare replicării. Eliminarea genelor nedorite din vectorul original se face pentru a nu stânjeni inserarea sau exprimarea genei de interes, legată la vector, sau pentru eliminarea unor efecte nocive. Practic, orice virus ADN poate fi utilizat ca vector, alături de plasmidele bacteriene.

Pasagerul este un fragment ADN conținând gena de interes și care, introdus în vector, se comportă pasiv, supunându-se principalelor procese la care este supus vectorul (replicare și exprimare).

Inițial pentru obținerea genelor de interes s-a folosit ruperea mecanică aleatorie a genomului (de tip *shot gun*). Ulterior, s-a recurs la tăierea cu enzime de restricție generatoare de capete coezive, utilizându-se de preferință aceeași enzimă ca și la vector, ceea ce favorizează procesul de ordonare (*annealing*) a fragmentelor, în vederea ligării. Ca atare, metoda era aplicabilă în cazul unui număr limitat de vectori și pasageri. După construirea ADN recombinat, prin intervenția ligazei, urmează:

Transformarea – procedeu pus la punct de Mandel și Higa (1970), cu implicarea Ca^{2+} și a unor șocuri termice. Ulterior s-au adus îmbunătățiri din punct

de vedere al eficienței și s-a recurs la electroporare (șocuri electrice) sau la folosirea lipozomilor sau a unor amine complexe (la eucariote).

Clonarea, adică obținerea unor colonii celulare cu progeni ai unei singure celule parentale, poate implica și selecția celulelor în care a pătruns ADN recombinat. În scopul selecției se folosesc diverși markeri (rezistență la antibiotice, cultivare pe medii care permit „developarea” celulelor transformate etc.).

Amplificarea, care presupune creșterea cantității de material extracromozomal (plasmide, fagi etc.).

Inițial, exprimarea genelor de interes s-a făcut anevoios, deoarece nu se cunoștea exact controlul exprimării lor.

2.3.2. SCHEMA ACTUALĂ

Aceasta nu diferă în principiu de cea inițială, dar se bazează pe o dezvoltare deosebită a noțiunilor/conceptelor.

Astfel, în domeniul vectorilor s-au făcut progrese deosebite, cu conturarea a trei tipuri:

- *vectori de clonare* – care asigură clonarea, dar nu garantează exprimarea; sunt utilizați pentru analiza de secvențe, asigurând cantitatea necesară de ADN;

- *vectori de exprimare* – care asigură exprimarea eficientă a genei de interes; sunt prevăzuți cu elemente de operoni (promotori, represori, o parte dintr-o genă structurală). Aceste elemente sunt specifice genelor procariote. La eucariote apar elemente diferite, fiind nevoie de o transcriere eficientă și de prelucrarea produsului transcris. Promotorul asigură legarea ARN polimerazei-ADN dependente și sinteza ARNm corespunzător genei. De asemenea, trebuie să existe secvențe nucleotidice necesare prelucrării ARNm (secvențe pentru 5'capping și pentru 3'poliadenilare), ceea ce îi asigură eficiența ulterioară la traducere;

- *vectori de integrare* – vectori care au elemente structurale și funcționale de interacțiune cu genomul gazdei, ceea ce le asigură inserția. Prezintă interes de viitor pentru terapia genică.

La procariote se folosesc vectori de clonare și exprimare de tip plasmidial sau derivați de la ADN λ (au anumite avantaje față de plasmide: pot fi „împachetați” în particule virale, iar infecția pe care o generează prezintă o eficiență mai mare decât transformarea).

La eucariote se utilizează vectori de exprimare proveniți de la eucariote inferioare (plasmide 2 μ din drojdii) sau vectori de mare eficiență, derivați de la virusuri (*Papovaviridae* – SV40; *Poxviridae* – vaccina; *Retroviridae* etc). Pentru plantele superioare se lucrează cu plasmida Ti (de la *A. tumefaciens*) etc.

În ceea ce privește pasagerul, s-au perfecționat căile de obținere a secvențelor de interes:

- *izolarea genei dintr-un genom prin hidroliză cu una sau mai multe enzime de restricție* (din câteva sute disponibile) – la organismele superioare se folosesc întâi *sonde moleculare* (cu structură complementară genei), pentru localizarea

secvenței de interes, care este apoi tăiată enzimatic. Izolarea se face electroforetic sau pe coloane cu anumite matrici.

- *construirea genei prin reverstranscriere* (pe matriță ARNm);
- *sinteza chimică a genei* implică un mare număr de procedee cu eficiență crescută, cum ar fi metoda fosfotriesterilor (cu blocarea grupărilor reactive) sau parcurgerea sintezei în fază solidă.

Ulterior, vectorii și pasagerii trebuie prelucrați în vederea asigurării unei bune cuplări a celor două elemente și a ligării necesare. Pentru vectori se recomandă defosforilarea cu fosfatază alcalină a capetelor moleculei, pentru evitarea recircularizării. Se mai practică și introducerea unor extensii poliA (în acest caz, la pasager se introduc secvențe complementare poliT) sau atașarea de *linkeri* la unul sau la ambele capete ale vectorului.

Linkerii, care au 10–40 nucleotide cu o anumită secvență, permit fie atașarea eficientă a pasagerului la vector, fie introduc un nou situs pentru o anumită enzimă de restricție. Un alt procedeu constă în eliminarea capetelor coezive sau în completarea lor. Eliminarea se face pentru realizarea de capete netede, iar completarea se face tot pentru „tocire” (cu ADN polimerază care astupă „gap-urile”).

Clonarea se poate realiza clasic, eventual completată și cu selecție. Identificarea se face prin hibridizare ADN-ADN sau ADN-ARN sau prin utilizarea metodelor imunochimice (RIA sau ELISA etc., cu anticorpii corespunzători), pentru evidențierea produsului de exprimare a genei respective,

Schema generală actuală a tehnologiei ADN recombinat este prezentată în fig. 12:

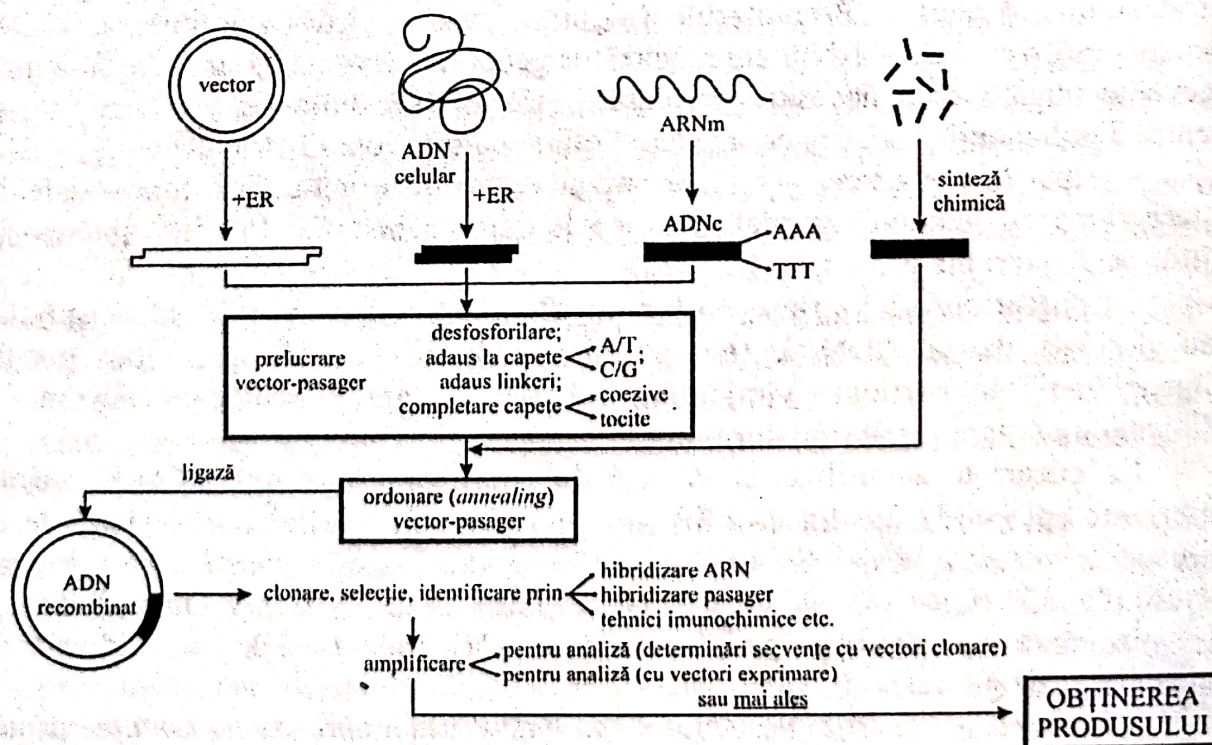


Fig. 12 – Schema generală a tehnologiei ADN recombinat.

ENZIME UTILIZATE ÎN TEHNOLOGIA ADN RECOMBINAT

Obținerea moleculelor de ADN recombinat presupune existența a două fragmente polinucleotidice cu rol bine determinat – *vectorul*, cu caracter de replicon autonom, și *insertul* sau *pasagerul*, adică gena străină care urmează a fi replicată sau exprimată. În final, aceste două entități trebuie să constituie un tot funcțional, asigurat prin legarea capetelor fragmentelor, întâi prin punți de hidrogen (care permit *annealing* sau ordonarea), iar apoi prin legături covalente fosfodiesterice. În vederea realizării moleculelor hibride, capetele vectorului și ale pasagerului trebuie să sufere prelucrări adecvate, asigurate de intervenția specifică a anumitor enzime. Pe de altă parte, tehnicile utilizate în tehnologia ADN recombinat reclamă și întrebuințarea altor tipuri de enzime, cu activități țintite în atingerea scopurilor urmărite.

3.1. NUCLEAZE

Nucleazele sunt hidrolaze din subclasa esterazelor, fiind implicate în scindarea fosfodiesterilor. Ele pot fi clasificate în funcție de locul lor de intervenție:

- *exonucleaze* – care acționează la extremitățile moleculelor de acizi nucleici și sunt utilizate pentru modelarea capetelor fragmentelor;
- *endonucleaze* – care intervin în interiorul moleculelor polinucleotidice, jucând rolul de „foarfeci moleculare”.

Se mai pot clasifica și în funcție de existența unei anumite secvențe nucleotidice pe care să o recunoască și/sau hidrolizeze, deosebindu-se:

- *nucleaze nespecifice*;
- *nucleaze specifice*.

3.1.1. NUCLEAZE NESPECIFICE

Aceste enzime acționează la capetele sau în interiorul moleculelor de acizi nucleici, fără a reclama prezența restrictivă a anumitor nucleotide/secvențe.

3.1.1.1. Deoxiribonucleazele I și II (DNaza I EC 3.1.21.1 și DNaza II EC 3.1.22.1). DNaza I este o enzimă hidrolitică ce digeră nespecific ADNdc printr-un mecanism *double hit*; la concentrații foarte mari este capabilă să atace și ADNmc, dar mecanismul reacției este de tip *single hit*. Ca urmare, apar fragmente oligonucleotidice, cu capete 5'-fosfat. Cele două DNaze se deosebesc prin valoarea pH optim (7,0–8,0 pentru DNaza I și 4,2–5,5 pentru DNaza II). DNaza I este intens utilizată pentru eliminarea moleculelor de ADN din preparatele de ARN, dar mai ales pentru realizarea digestiei limitate în cadrul analizei *footprint* (absența la vizualizarea electroforegramelor a anumitor nucleotide protejate față de enzima hidrolitică prin complexarea cu molecule specifice). Activitatea DNazei I este dependentă de prezența ionilor Mg^{2+} , care pot fi eventual înlocuiți cu alți ioni divalenți (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}), cu scăderea parțială a activității.

3.1.1.2. Nucleaza micrococală (EC 3.1.31.1) este o endonuclează care hidrolizează legăturile 5'-fosfodiesterice din ADN. O unitate enzimatică produce 1 μ M de polinucleotide acidosolubile din ADN liniar ca substrat, într-un minut de incubare la 37°C, în tampon cu pH 8,8, pe baza relației $E_{260}^M = 10\,000$ (1 μ M corespunde la circa 85 unități A_{260} , iar 1 U_{260} corespunde unei extincții cu valoarea 1, în 30 de minute la pH 8,8 la 37°C, într-un volum de reacție de 3,55 ml, în cuvă cu drum optic de 1 cm).

3.1.1.3. Nucleaza S1 (EC 3.1.31.1) degradează endonucleolitic atât ADNmc, cât și ARN, cu obținerea capetelor 5'-fosfat. Acizii nucleici bicatenari (ADN, ARN sau ADN:ARN) rezistă la hidroliză, fiind scindați doar la concentrații enzimatică ridicate. Din proprietățile enzimei derivă și aplicațiile sale: îndepărtarea extensiilor monocatenare din ADNdc, hidroliza selectivă a ADNmc și cartarea transcripțiilor ARN.

Cantitatea de enzimă necesară pentru producerea a 1 μ g de material acidosolubil, într-un minut, la 37°C, în tampon acetat de sodiu 30 mM pH 4,6 cu NaCl 50 mM – $ZnCl_2$ 1 mM, pe ADN denaturat de timus de vițel 0,5 μ g/ml, reprezintă o unitate de activitate pentru această enzimă.

3.1.1.4. Nucleaza BAL31 (EC 3.1.11) este de fapt un amestec de enzime de origine extracelulară, care provin din specii de bacterii *Alteromonas*, de la care vine denumirea. Se cunosc două forme moleculare și cinetice: subunitatea *S* (*slow*) de 85 kDa derivă din subunitatea *F* (*fast*) de 109 kDa, care – la rândul ei – are un precursor și mai mare. Activitatea formei *S* este mult mai dependentă de compoziția în baze G+C a substratului decât cea a formei *F*. Sunt enzime cu o mare rezistență la inactivarea termică sau la denaturarea cu detergenți, uree, concentrații ridicate de electroliți, ceea ce le conferă o stabilitate de câțiva ani, atunci când sunt păstrate la 4°C, în prezența Ca^{2+} sau Mg^{2+} 5 mM. De asemenea, rezistă foarte bine în soluții hipersaline; astfel, poate acționa pe ADNmc în NaCl 0,6 M, dar la

concentrații saline mai reduse acționează și pe ADNdc. Prin acțiunea acestei enzime rezultă preponderent capete netede, care pot fi ligate cu T4 ADN ligază.

Față de moleculele de ADN, nucleazele BAL31 prezintă trei tipuri de activități:

- 3'→5'exonucleazică, ce îndepărtează din duplex nucleotid după nucleotid;
- 5'→3'exonucleazică, producând degradarea ADNmc;
- endonucleazică, în ADNmc (cam 2–3% din activitatea exonucleazică).

Combinarea celor trei activități are ca urmare reducerea lungimii duplexului ADN liniar. Moleculele parțial degradate pot prezenta „cozi” 5', dar nu de tip 3'. Nucleazele BAL31 sunt cele mai eficiente enzime cunoscute pentru reducerea controlată a dimensiunii moleculelor de ADN și par a fi singurele care pot media reacția respectivă pentru ARNdc. De asemenea, ele permit obținerea unor deleții unidimensionale.

Activitatea exonucleazică este blocată de existența nucleozomilor sau a unor legături intercatenare, ceea ce a servit pentru localizarea structurilor de acest tip pe duplexul de ADN. Lucrează la un pH optim 8,5–8,8 atunci când acționează pe ADNmc și la pH 7,0–8,0 pe ADNdc. Necesită prezența Ca^{2+} sau Mg^{2+} (10–15 mM) drept cofactor. Pe ADNmc temperatura optimă de acțiune este de 60°C, dar se recomandă lucrul la 30°C, pentru evitarea riscului de introducere a unor creștături aleatorii.

O unitate enzimatică este corespondentul cantității necesare pentru îndepărtarea a câte 200 pb de la fiecare capăt a 33 μg ADNdc liniar în 10 min, la 37°C, pH 8,0, lucrând în tampon Tris.HCl 20 mM cu NaCl 0,6 M – CaCl_2 12 mM – MgCl_2 12 mM – EDTA 1 mM.

3.1.1.5. Nucleaza 1 din *Phaseolus aureus* (EC 3.1.30.1) prezintă preferință pentru ADNmc, producând prin hidroliză capete 5'-fosfat și 3'-OH. Activitatea pe ADNmc este de 30 000 de ori mai mare decât pe ADNdc, pe care intervine doar la concentrații ridicate, iar pentru stabilitate și o bună desfășurare a reacției reclamă prezența ionilor Zn^{2+} , precum și a cisteinei, ca agent reducător. Acționează endonucleolitic și pe ARN. Electroforeza în poliacrilamidă, în condiții reducătoare, a evidențiat că nucleaza 1, având o masă moleculară de circa 35–38 kDa, este formată din două subunități de 15 și respectiv 25 kDa, legate printr-o punte disulfurică. Acționează la un pH optim 5,0. La pH 7,0 degradează ADN superîncolăcit de circa 20 000 de ori mai repede decât ADN relaxat. Este o enzimă sensibilă la modificările de tărie ionică, stabilitatea maximă (6 luni) fiind la pH 5,0 în tampon cu Zn^{2+} 0,1 mM – cisteină 1 mM – Triton X-100 (0,001%).

Enzima se folosește pentru îndepărtarea extensiilor și realizarea capetelor netede, adeseori în completarea acțiunii nucleazei BAL31. Este nucleaza de elecție pentru eliminarea extensiilor rezultate prin reacții de restricție. Nu acționează pe catena opusă unei creștături într-un duplex, ceea ce o deosebește de exonucleaza S1.

O unitate este reprezentată de cantitatea de enzimă capabilă să producă 1 μ g de nucleotide acidosolubile pe minut, la 37°C, în tampon acetat de sodiu 30 mM pH 4,6 cu NaCl 50 mM – ZnCl₂ 1 mM – glicerol 5%, având drept substrat ADN de timus de vițel denaturat sau ADNmc din sperma de somon.

3.1.1.6. Exonucleaza III (EC 3.1) este o enzimă cu specificitate 3'→5' pentru ADNdc cu capete netede sau cu extensii 5' (dar nu 3') sau având creștături. Enzima manifestă activitate endonucleazică specifică pentru regiunile apurinice, iar în anumite cazuri se manifestă și ca RNază H sau ca 3'fosfatază.

O unitate enzimatică produce 1 nM de nucleotide acidosolubile din ADN timus de vițel 125 μ g, după o incubare de 30 min, la 37°C, în tampon Tris.HCl 50 mM pH 7,6 cu MgCl₂ 1 mM - DTT 1 mM.

Între aplicațiile acestei enzime sunt de menționat obținerea ADNmc necesar ca matriță în secvențializarea prin metoda dideoxinucleotidelor, precum și obținerea unui set de deleții în interiorul moleculelor de ADNdc liniar.

3.1.1.7. Nucleaza S1 (EC 3.1), izolată din fungi, acționează pe monocatene ADN sau ARN. ADNdc, ARNdc și hibridii ADN:ARN sunt rezistenți față de degradare, exceptând cazurile în care se utilizează concentrații mari de enzimă. Se folosește pentru cartarea transcripților și a intronilor sau pentru clivarea structurilor „în-ac-de-păr”. Activitatea enzimatică se desfășoară în prezența ionilor Zn²⁺, la pH 4,5.

3.1.1.8. RNaza I (EC 3.1.27.5). În general, RNazele produc scindări endo- și exo- nucleolitice, fiind un contaminant comun al DNazei I. Cea mai utilizată este RNaza I pancreatică, reprezentată de un polipeptid de circa 12,6 kDa; ea conține în moleculă patru punți disulfurice, esențiale pentru exercitarea activității, abolită prin reducere. RNaza I este una dintre cele mai stabile enzime, prezentând și o remarcabilă termorezistență. Activitatea RNazică nedorită poate fi inactivată de substanțe cu grupări -SH liber (cum ar fi 2-mercaptoetanolul 0,1 M), de către dodecilsulfatul de sodiu, de izotiocianatul de guanidină 4 M, de dietilpirocarbonat etc.

RNaza I se folosește pentru purificarea preparatelor de ADN, hidrolizând moleculele de ARN contaminante.

3.1.1.9. RNaza H (EC 3.1.4.34) din *E. coli* este o endoribonuclează care hidrolizează specific legăturile fosfodiesterice din hibridii ARN:ADN apăruiți în cursul reacției de reverstranscriere, fără să afecteze acizii nucleici monocatenari sau ADNdc și ARNdc.

Conform definiției, o unitate de RNază H produce 1 nM de ribonucleotide acidosolubile din 20 μ M [³²P]-poli(rA):poli(dT) în interval de 20 min, la 37°C, în tampon HEPES 20 mM – KOH pH 7,8 cu KCl 50 mM – MgCl₂ 10 mM – DTT 1 mM.

RNaza H este utilizată pentru îndepărtarea catenei ARN din hibridii ARN:ADN formați în cursul procesului de reverstranscriere, anterior sintezei ADN complementar. De asemenea, se mai folosește pentru analiza *in vitro* a produselor de poliadenilare.

3.1.2. NUCLEAZE SPECIFICE

Specificitatea nucleazelor poate fi una extinsă sau una strict limitată. În general, în prima categorie pot fi incluse o serie de RNaze, utilizate inițial pentru determinarea structurii primare, adică pentru secvențializarea moleculelor ARN. Astfel, pot fi menționate:

RNaza T1	(din <i>Aspergillus oryzae</i>)	Gp↓N
RNaza U2	(din <i>Ustilago sphaerogena</i>)	Ap↓N
RNaza PhyM	(din <i>Phaseolus polycephalus</i>)	Ap↓N, Up↓N
RNaza B	(din <i>Bacillus cereus</i>)	Up↓N, Cp↓N
RNaza CL3	(din ficat de pui - <i>chicken liver</i>)	Cp↓N
nucleaza M1	(din <i>Cucumis melo</i>)	N↓pA, N↓pU, N↓pG
RNaza V1	(din veninul de cobra)	hidrolizează ARNdc

Dar cele mai importante nucleaze specifice, cu o largă utilizare în tehnologia ADN recombinat, sunt endonucleazele de restricție.

3.1.2.1. Enzimele de restricție (EC 3.1.21.3, EC 3.1.21.4, EC 3.1.21.5) recunosc secvențe specifice în ADNdc și taie ambele catene. Ele au fost identificate în numeroase celule procariote (bacteriene) și sunt parte dintr-un sistem enzimatic.

Fenomenul de restricție și modificare a fost observat și descoperit de către Luria și Human (1952) și de către Bertani și Weigle (1953). Ei au arătat că bacteriofagul λ cultivat pe gazda *E. coli* C nu se propagă eficient pe o altă gazdă, *E. coli* K. După mai multe pasaje, situația se inversează: fagul cultivă bine pe *E. coli* K, dar la repasarea pe *E. coli* C randamentul este slab la început; prin repetarea cultivării se reușește readaptarea.

Observația a fost apoi extinsă și la alte sisteme fag-bacterie. Bazele moleculare ale fenomenului au fost identificate ulterior de către Arber și Dussoix (1962), care au menționat unul dintre rolurile probabile ale sistemelor de restricție și modificare R-M; ei au demonstrat existența unor sisteme enzimatice care, pe de o parte, distrug informația din ADN străin prin intermediul enzimelor nucleolitice numite „de restricție”, iar pe de altă parte apără ADN propriu prin modificare cu ajutorul unor metilaze specifice (a căror acțiune duce la blocarea activității restrictazelor din aceeași celulă). S-ar putea ca acesta să fie motivul pentru care fagii T pari (T2, T4, T6) prezintă în genomul lor resturi de hidroximetilcitozină glicozilată, care înlocuiește citozina, astfel încât ADN respectiv devine rezistent la acțiunea multor enzime de restricție, iar fagul poate infecta bacteria corespunzătoare.

Nomenclatura enzimelor de restricție a fost propusă și introdusă de Smith și Nathans (1973); desemnarea se face prin prima literă a denumirii genului bacteriei, urmată de primele două litere ale denumirii speciei. Celelalte litere sau cifre indică fie tulpina din care s-a izolat enzima, fie ordinea descoperirii mai multor activități în aceeași tulpină. Pe baza caracterizării lor biochimice și a particularităților

enzimelor de restricție (arhitectura moleculară din subunități, modul lor de tăiere, necesitatea prezenței unor factori pentru exercitarea activității), se deosebesc trei tipuri de sisteme R-M, corespunzătoare la trei tipuri de enzime de restricție, clasificate conform tabelului 3.

Tabelul 3

Clasificarea enzimelor de restricție

Exemple	tip I <i>Eco K</i>	tip II <i>Eco RI</i>	tip III <i>Eco P</i>
Subunități	3 (diferite)	2 (identice)	2 (diferite)
Activitate	de restricție, de modificare, topoisomerezică, ATPazică	de restricție	de restricție, de modificare, ATPazică
Cofactori	Mg ²⁺ , ATP, SAM	Mg ²⁺	Mg ²⁺ , ATP, SAM
Secvență de recunoaștere	AACNNNGTGC	G↓AATTC	AGACC
Situs de tăiere	nespecific, variabil, la mare distanță (400–7 000 pb) de situsul de recunoaștere	în interiorul situsului (la săgeată)	la 25–27 pb față de situsul de recunoaștere

Între enzimele de restricție de tip III, un grup cu circa 10 reprezentanți cunoscuți în prezent – desemnați drept clasa IIIS sau Shifter – alcătuiesc o categorie aparte, care teoretic taie ADN la o localizare predeterminată.

La ora actuală se cunosc mai mult de 1 200 de enzime de restricție, dar multe dintre ele sunt izoschizomere, adică recunosc și taie aceeași secvență din ADN; s-au descris în total circa 130 de specificități diferite. Izoschizomerii pot diferi din punctul de vedere al poziției de hidroliză (*Xma* I C↓CCGGG și *Sma* I CCC↓GGG), al sensibilității față de modificarea prin metilare (*Msp* I taie C^{m4/5}↓CGG, iar *Hpa* II nu) sau al vitezei de hidroliză a situsului respectiv (*Xho* I și *Pae* R7 I) etc. După cum reiese din tabelul de mai sus, aceste nucleaze specifice taie fie în interiorul secvenței de recunoaștere, fie în apropierea ei, rezultând capete coezive (lipicioase, cu extensii 5' sau 3') sau capete netede (tocite). Numai pentru *E. coli* au fost izolate și descrise 141 de enzime de restricție, cu circa 40 de specificități! Apartenența la sisteme de restricție și modificare a fost descrisă doar pentru un număr foarte mic de restrictaze. Un număr și mai mic a putut fi purificat la omogenitate și caracterizat biochimic.

La rândul lor, enzimele de restricție de tip II au fost și ele clasificate, în funcție de numărul de baze care intră în situsul de recunoaștere, reprezentat cel mai adesea printr-un palindrom (secvență care citită în sensul 5'→3' este identică celei citite pe catena complementară, în același sens). Se deosebesc mai multe grupe de enzime, care recunosc (și taie) situsuri de 4–8 nucleotide implicate în procesul de recunoaștere, cele mai numeroase având 4 sau 6 nucleotide (unele fiind, de altfel, izoschizomere) (tabelul 4).

Probabilitatea apariției situsurilor de restricție este dependentă de structura primară a fiecărui ADN. S-a calculat că, într-o moleculă cu 50% G+C, un situs de recunoaștere de 4 pb poate apărea o dată la 256 pb, unul de 6 pb o dată la circa 4 kpb, iar unul de 8 pb la circa 64 kpb. Întrucât conținutul G+C variază în limite foarte largi (22–73%), există și o mare dispersie a numărului și tipului de situsuri de restricție pentru diverse genoame, fiind însă cunoscute și enzime care recunosc situsuri cu un alt număr de nucleotide (tabelul 5):

Tabelul 4

Enzime de restricție care recunosc palindroame propriu-zise, de 4 și 6 nucleotide

4 pb	6 pb
<i>Alu I</i> A G↓CT T C↓GA	<i>Eco RI</i> G↓AATT C C TTA A↓G
<i>Hae III</i> G G↓CC C C↓GG	<i>Bam HI</i> G↓GATC C C CTA G↓G
<i>Hpa II</i> C↓CGG G G C↓C	<i>Bgl II</i> A↓GATC T T CTA G↓A
	<i>Hind III</i> A↓AGCT T T TCG A↓A
	<i>Hpa I</i> GTT↓AAC CAA↓TTG
	<i>Pst I</i> C T GCA↓G G↓ACGT C

Tabelul 5

Enzime de restricție care recunosc situsuri cu 5, 7 și 8 nucleotide

5 pb	7 pb	8 pb
<i>Afl I</i> G↓GWCC	<i>Ppu MI</i> RG↓GWCCY	<i>Not I</i> GC↓GGCCGC
<i>Aha I</i> CC↓WGG	<i>Rsr II</i> CG↓GWCCG	
<i>Bcn I</i> CC↓SGG		
<i>Eco RII</i> ↓CCWGG		

unde R este A/G, S - G/C, W - A/T, Y - T/C

Există, de asemenea, restrictaze de tip II care recunosc palindroame cu 1–9 nucleotide nespecificate în centru (tabelul 6) sau enzime care recunosc secvențe nonpalindromice, dar acestea constituie excepții (tabelul 7).

O unitate de enzimă de restricție este reprezentată de cantitatea de enzimă necesară digestiei complete a 1 μg ADN fag λ (sau alt ADN cu structură cunoscută) în 60 min, la temperatura optimă (de obicei, la 37°C, cu unele excepții cum ar fi *Sma I*, *Bcl I* – 25°C; *Apa I* – 30°C; *Bsp MII* – 55°C; *Bsp MI*, *Taq I* – 65°C etc.), într-un volum de reacție de 50 μl, în tampon cu tărie ionică optimă. Din acest punct de vedere, au fost elaborate câteva formule standard de tampoane, în funcție de cerințele diferitelor enzime (tabelul 8). În general, activitatea este substrat dependentă.

Tabelul 6

Enzime de restricție care recunosc palindroame cu inserții în centru

4 pb	6 pb	8 pb
<i>Dde</i> I C↓TNAG	<i>Alw</i> NI CAGNNNN↓CTG	<i>Sfi</i> I GGCCNNNN↓NGGCC
<i>Hinf</i> I G↓ANTC	<i>Axy</i> I* CC↓TNAGG	
<i>Mae</i> III ↓GTNAC	<i>Bgl</i> I GCCNNNN↓NGGC	
<i>Sau</i> 96I G↓GNCC	<i>Dra</i> II* RG↓GNCCY	
	<i>Eco</i> NI CCTNN↓NNNAG	
	<i>Tth</i> III* GACN↓NNGTC	
	<i>Xmn</i> I* GAANN↓NNTTC	
	unde R este A/G, iar Y - T/C	

Tabelul 7

Enzime care recunosc secvențe non-palindromice

4 pb	5 pb	6 pb
<i>Mnl</i> I 5'-CCTCN ₄ ↓-3' 3'-GGAGN ₇ ↓-5'	<i>Alw</i> 261 5'-GTCTCN↓-3' 3'-CTGAGN ₅ ↓-5'	<i>Bsm</i> I 5'-GAATGCN↓-3' 3'-CTTAC↓G-5'
	<i>Alw</i> I 5'-GGATCN ₄ ↓-3' 3'-CCTAGN ₅ ↓-5'	<i>Bsp</i> MI 5'-ACCTGCN ₄ ↓-3' 3'-TGGACGN ₄ ↓-5'
	<i>Fok</i> I 5'-GGATGN ₉ ↓-3' 3'-CCTACN ₁₃ ↓-5'	<i>Eco</i> 3II 5'-GGTCTCN↓-3' 3'-CCAGCGN ₅ ↓-5'
	<i>Hph</i> I 5'-GGTGAN ₈ ↓-3' 3'-CCACTN ₇ ↓-5'	
	<i>Mbo</i> II 5'-GAAGAN ₈ ↓-3' 3'-CTTCTN ₇ ↓-5'	

Există și alte excepții, puțin numeroase, în ceea ce privește enzimele de tip II. Astfel, *Gsu* I și *Bsm* I pe o catenă taie în secvența de recunoaștere, dar pe catenă complementară taie în afara acesteia.

Tabelul 8

Sisteme de tamponare pentru enzime de restricție

Componentele tamponului	Concentrația finală (în mM/l)				
	A ^a	B ^b	L ^c	M ^d	H ^e
Tris.CH ₃ COOH	33	—	—	—	—
Tris.HCl	—	10	10	10	50
(CH ₃ COO) ₂ Mg	10	—	—	—	—
MgCl ₂	—	5	10	10	10
CH ₃ COOK	66	—	—	—	—
NaCl	—	100	—	50	50

(continuare tabelul 8)

Ditiotreitol	0,5	–	–	–	–
Ditioeritritol	–	–	1	1	1
2-Mercaptoetanol	–	1	–	–	–
pH la 37°C	7,9	8,0	7,5	7,5	7,5

Exemple: ^a - *Alu* I, *Hae* II, *Hpa* I etc.; ^b - *Bam* HI, *Eco* RV, *Hind* III etc.; ^c - *Hpa* II, *Kpn* I, *Rsa* I etc.; ^d - *Hind* II, *Dra* I, *Pvu* II etc.; ^e - *Bgl* I, *Eco* RI, *Hinf* I, *Pst* I etc.

Specificitatea enzimelor de restricție poate fi uneori modificată. În aceste condiții apare așa-numita activitate „star”, observată pentru prima oară la *Eco* RI, la care a fost și cel mai bine studiată. Astfel, alterarea condițiilor de reacție (tărie ionică scăzută, pH mai mare decât cel optim, înlocuirea Mg^{2+} cu Mn^{2+} , prezența glicerolului sau a DMSO în cantități supraoptimale, concentrația prea mare de enzimă de restricție) duce la acțiunea asupra unor situsuri „neclasice” (la *Eco* RI*, $G\downarrow AATTC$ este înlocuit cu altele, fiind recunoscute inclusiv situsuri care diferă de cel standard printr-o singură bază; pot avea loc diverse substituții, dar nu $A\rightarrow T$ sau $T\rightarrow A$ în tetranucleotidul central).

Inhibiția enzimelor de restricție poate fi provocată nespecific, de prezența EDTA care chelatează ionii de Mg^{2+} absolut necesari activității, sau specific, de către metilaze, care modifică covalent situsul de recunoaștere și tăiere; metilarea se produce mai ales la ^{16}A sau la ^{15}C , făcând ADN de „nerecunoscut” pentru enzima de restricție.

În general, bacteriile produc cantități mici de enzime de restricție (1–10 mg/kg substanță uscată).

A fost determinată structura primară în aminoacizi a circa 40 de enzime de restricție, constatându-se în unele cazuri un înalt grad de omologie, cum ar fi pentru *Eco* RI/*Rsr* I sau *Bsu* FI/*Msp* I etc; deoarece acestea sunt enzime izoschizomere, funcția comună reflectă structura comună. În cazul altor enzime de restricție, cum ar fi *Bsu* RI - *Pae* R7 - *Pst* I, au fost găsite motive comune (10–20 aminoacizi, dublu repetate). Enzimele de restricție de tip II sunt cele mai utilizate în tehnologia ADN recombinat și sunt dimeri ai unor subunități de 25–35 kDa, cu excepții de subunități mai mari, de 43–67 kDa. Alte enzime, *Bgl* I, *Bsp* RI, *Pal* I etc. sunt mult mai mici, prezentând un singur monomer, sub 25 kDa.

Studiile cristalografice comparative întreprinse asupra *Eco* RI și *Eco* RV au arătat că, deși ele nu prezintă același aranjament topologic al elementelor de structură secundară, au aceeași formă generală: cele două subunități identice sunt aranjate astfel încât apare o cavitate, echivalentă cu situsul de legare la ADN. Ambele enzime formează complexe cu dublă simetrie, adică subunitățile sunt implicate în același set de interacțiuni. Aceste observații sunt valabile pentru majoritatea enzimelor de restricție de tip II.

În general, endonucleazele cu situsuri de recunoaștere simetrice (prezentând o axă) taie în interiorul secvenței implicate sau adiacent ei. Cele care recunosc situsuri asimetrice au tendința de a hidroliza la distanță față de acestea.

Profilul de restricție este caracteristic fiecărui tip de ADN. Mutațiile punctiforme sau rearanjamentele din molecula ADN duc la modificări ale lungimii unora din fragmentele de restricție, obținându-se un profil diferit față de ADN de referință. În acest fel se determină RFLP.

Prin restricție se poate face și analiza stării de metilare a ADN obținut din diverse surse naturale, starea de metilare putând fi corelată cu nivelul de exprimare a genei. Rezultă așa numita amprentă (*fingerprint*). Pentru realizarea acestui studiu pot fi folosite anumite perechi de izoschizomeri (tabelul 9):

Tabelul 9

Perechi de enzime de restricție izoschizomere

Metilare la	Secvența metilată	Tăiată de	Netăiată de
CG	C ^{m5} CGG	<i>Msp</i> I	<i>Hpa</i> II sau <i>Hap</i> I
	GAT ^{m5} C	<i>Mbo</i> I	<i>Sau</i> 3AI
	GGTAC ^{m5} C	<i>Kpn</i> I	<i>Asp</i> 718
GCAT	G ^{m6} ATC	<i>Sau</i> A3I	<i>Mbo</i> I sau <i>Nde</i> II
	TCCGG ^{m6} A	<i>Bsp</i> MII sau <i>Mro</i> I	<i>Acc</i> III
CNG	GGTA ^{m5} CC	<i>Kpn</i> I	<i>Asp</i> 718
	T ^{m5} CCGGA	<i>Acc</i> II	<i>Bsp</i> MII

Așa cum s-a relatat la începutul prezentării enzimelor de restricție, prezența Mg^{2+} este esențială pentru activitatea tuturor, ionii respectivi participând probabil la evenimentele catalitice, prin polarizarea legăturii fosfat care urmează să fie hidrolizată și/sau la activarea apei pentru formarea reactantului nucleofil necesar.

Enzimele de restricție pot acționa legându-se specific sau pot interacționa nespecific. În funcție de condițiile de reacție, în special de tăria ionică, situsurile de restricție pot fi hidrolizate consecutiv pe ambele catene, cu enzima rămasă atașată la ADN după tăierea celei dintâi catene. Acest mecanism este mai probabil decât tăierea distributivă, cu enzima disociată după prima tăiere și reatașată (fig. 13).

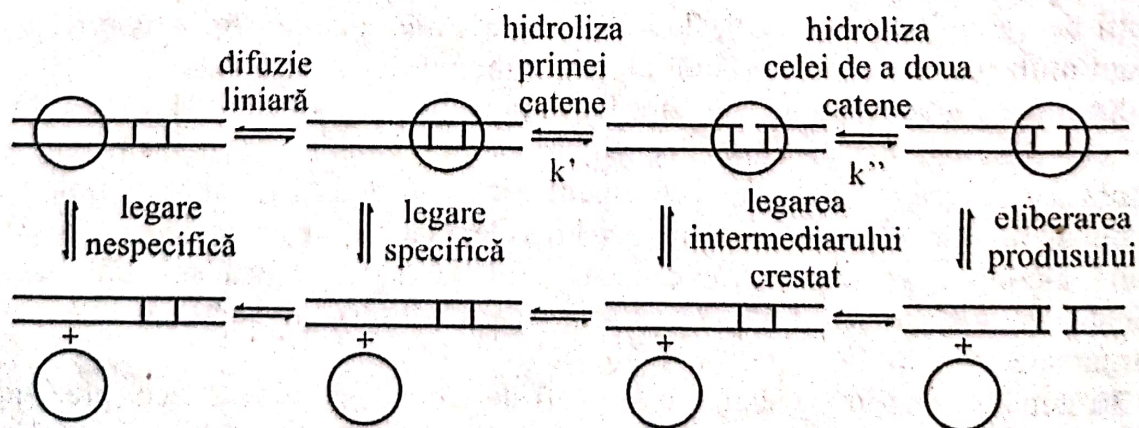


Fig. 13 – Mecanisme propuse pentru acțiunea enzimelor de restricție.

Ionii Mg^{2+} sunt necesari pentru hidroliză, dar nu condiționează o legare foarte puternică. Partea moleculară din afara situsului de recunoaștere are de asemenea importanță pentru interacția ADN-enzimă. Enzimele de restricție sunt enzime „lente”, cu un *turnover* de $1-10 \text{ min}^{-1}$. Energia de activare a reacției enzimatică este $E_a = 50 \pm 23 \text{ kJ/M}$, iar entalpia de inactivare $H_i = 190 \pm 75 \text{ kJ/M}$. Viteza de hidroliză este relativ puțin influențată de gradul de suprspirare a substratului, dar depinde de secvențele adiacente ale situsului de recunoaștere. De exemplu, s-a stabilit că *Eco* RI clivează cu viteze diferite cele 5 situsuri pe care le recunoaște în ADN de fag λ .

Multe din aplicațiile tehnologiei ADN recombinat au fost posibile pe seama elaborării hărților de restricție corespunzătoare, obținute prin diverse strategii. Se procedează la hidroliza ADN cu o anumită endonuclează restrictivă și la determinarea electroforetică a numărului și masei moleculare a fragmentelor rezultate în cantități echimoleculare. Se apreciază numărul situsurilor pentru o enzimă dată. Seria de analize se reia apoi pentru alte și alte enzime. În final, se assemblează rezultatele, cu elaborarea hărților specifice pentru ADN studiat.

3.2. POLIMERAZE

3.2.1. ADN POLIMERAZE

Acestea catalizează formarea moleculelor ADN din monomeri dNTP, în funcție de condiții ele prezentând uneori și alte activități asociate. Toate necesită prezența ionilor Mg^{2+} . Pe baza cerințelor lor pentru exercitarea activității se deosebesc:

3.2.1.1. ADN polimeraze-ADN dependente (EC 2.7.7.7) sunt enzime care reclamă existența unei matrite ADNmc și a unor primeri (amorse), hibridizate cu matrita; aditia dNTP se face la capătul 3' al amorsei;

ADN polimerazele-ADN dependente sunt enzime utilizate în numeroase scopuri: pentru marcare (cu izotopi radioactivi sau cu analogi nucleotidici) în cazul secvențializării sau al realizării unor sonde de hibridizare, pentru inducerea de modificări la capetele moleculelor de ADN, pentru amplificarea ADN prin PCR etc.

În celulele *E. coli* au fost descoperite pe rând mai multe ADN polimeraze-ADN dependente. *ADN polimeraza I* (pol I) sau enzima lui Kornberg este o proteină globulară cu masa de 109 kDa, care acționează prin atacul nucleofil al deoxinucleozidtrifosfaților la capătul 3'-OH liber al lanțului de acid nucleic în creștere. Pol I umple discontinuitățile (*gap*) între fragmentele Okazaki, lăsate de pol III pe catena decalată (*lagging*) la replicarea moleculelor ADN (ulterior ligate de către ADN ligază), având un rol major în reparare. De asemenea, enzima prezintă activitate exonucleazică 3'→5' (de fidelitate, de *proofreading*) și 5'→3' proprii, care nu pot fi dissociate de celelalte activități ale sale. În general, este folosită la marcarea ADN prin reacția de *nick*-translație. Pentru a fi activă, enzima are nevoie de prezența grupărilor -SH. 1 U enzimatică este cantitatea necesară

pentru incorporarea a 10 nM dNTP sub formă acidoinsolubilă în timp de 30 min, la 37°C, în tampon fosfat potasic 67 mM pH 7,5 cu MgCl₂ 6,7 mM - DTT 1 mM - ADN timus de vițel (activat) 133 μM - dNTP câte 33 μM din fiecare. Activitatea specifică a acestei polimeraze este destul de scăzută.

Prin tratarea holoenzimei cu subtilizină rezultă așa-numitul *fragment Klenow* (cu o masă de 76 kDa), căruia îi lipsește activitatea 5'→3' exonucleazică a polimerazei I intacte, dar reține activitatea 3'→5' exonucleazică, cea 5'→3' polimerazică, precum și capacitatea de a se deplasa de-a lungul catenelor. Fragmentul Klenow servește pentru secvențializare prin metoda dideoxinucleotidelor (Sanger), pentru marcarea capetelor 3' ale ADNdc cu dNTP marcați radioizotopic, pentru sinteza celei de a doua catene a ADNdc și pentru completarea extensiilor 5' ale ADNdc digerat cu enzime de restricție.

ADN polimeraza II (pol II) este o enzimă a cărei activitate este asociată cu membrana celulară, dar nu este utilizată în biologia moleculară.

ADN polimeraza III (pol III) este enzima răspunzătoare de replicarea propriuzisă și inițiază creșterea ambelor lanțuri ADN (atât prin sinteza continuă pe catena conducătoare, cât și prin sinteza discontinuă pe catena decalată), pornind de la primerii ARN. Holoenzima pol III este un complex format din 13 polipeptide. Subunitățile α, ε, θ formează „miezul” (*core*), la care se atașează subunitățile accesorii β, γ, δ, τ. Unitatea enzimatică este definită la fel ca la ADN polimeraza I.

ADN polimeraze procariote cu proprietăți similare sau cu anumite particularități au mai fost izolate și din alte microorganisme decât *E. coli*, cum ar fi *B. subtilis*, *M. lysodeikticus* etc., dar cele de mare interes sunt cele aparținând unor celule *E. coli* infectate cu fagi T4 sau T7, sau unor bacterii termofile precum *Thermus aquaticus*, *Pyrococcus furiosus*, *Thermus flavus*, *Thermus thermophilus* etc.

Astfel, T4 ADN polimeraza (având o masă de 114 kDa) este folosită pentru marcarea capetelor 3'; ea catalizează sinteza ADN în sensul 5'→3' pornind de la o matriță ADNmc, la care a hibridizat o amorsă. Manifestă o puternică activitate 3'→5' exonucleazică (de *proofreading*), dar este lipsită de cea 5'→3'.

T7 ADN polimeraza (masa moleculară a subunităților variază între 80–85 kDa) este polimeraza cu cea mai mare viteză de prelucrare, ea putând elonga un primer cu câteva kpb, fără disociere de pe substrat; această enzimă este „tolerantă” față de analogii nucleotidici, ceea ce o face foarte utilă în secvențializare sau pe parcursul tehnicilor de marcarea a oligonucleotidelor. Ca și T4 ADN polimeraza, are doar activitate puternică 3'→5' exonucleazică.

ADN polimerazele izolate din bacteriile termofile au o largă aplicabilitate în reacția PCR. Între acestea, prima introdusă a fost *Taq* pol din *Th. aquaticus* tulpina YT1, a cărei masă moleculară variază în funcție de sușă (60–97 kDa). Prezintă activitate 5'→3' polimerazică de mare procesivitate și acțiune exonucleazică 5'→3' cu deplasare de-a lungul catenei, dar nu are acțiune 3'→5' *proofreading*. Temperatura optimă de lucru este la 80°C, dar suportă până la 95°C, timp de mai multe cicluri de reacție. 1 U enzimatică este reprezentată de cantitatea de material

necesară pentru încorporarea a 10 nM ^3H -dTTP timp de 30 min, la 80°C, în tampon Tris.HCl 10 mM pH 8,8, conținând KCl 50 mM - MgCl_2 1,5 mM - gelatină 0,001% (g/v) - dNTP 200 μM fiecare - 1 μM primer. Acestei enzime a început să-i ia locul *Pfu* pol, care prezintă avantajul activității *proofreading*, ceea ce face replicarea mai puțin expusă la erori, ea fiind de circa 12 ori mai fidelă în transcriere decât *Taq* pol. Optimumul de temperatură al acesteia este în jurul a 75°C, dar își păstrează peste 95% din activitate și după o oră la 95°C. Definiția unității de activitate este asemănătoare celei pentru *Taq* pol, cu excepția timpului și temperaturii de lucru, care în acest caz sunt de 30 min, la 72°C.

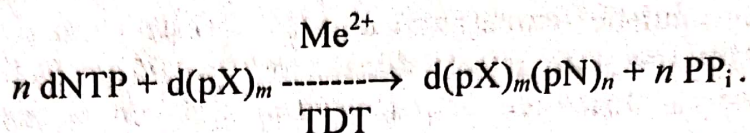
La eucariote au fost, de asemenea, identificate mai multe tipuri de ADN polimeraze-ADN dependente, desemnate ca α , β , γ , δ . ADN pol α răspunde mai ales de replicarea ADN cromozomal, pe când γ este implicată în replicarea ADN mitocondrial. Nu sunt folosite curent în tehnicile de biologie moleculară.

3.2.1.2. ADN polimeraze-ARN dependente (EC 2.7.7.49) sau revertranscriptaze RTaze au nevoie de o matriță ARN, pe care să își desfășoare activitatea. Ele sunt produse de exprimare ale genei *pol* din genomul retrovirusurilor. Folosesc drept matriță ARN, ADN sau hibridi ADN:ARN, având nevoie de prezența primerilor specifici și a ionilor Mg^{2+} sau Mn^{2+} , prezentând, de asemenea, și activitate intrinsecă de RNază H. Cele mai utilizate revertranscriptaze sunt cele ale virusurilor mieloblastozei aviare (*avian myeloblastosis virus* AMV) și leucemiei murine Moloney (*Moloney murine leukemia virus* MoMLV), între care există asemănări și deosebiri. Astfel, RTaza-AMV, formată din două subunități polipeptidice, este stabilizată de prezența detergenților neionici și a compușilor sulfhidrilici și este mai activă ca RNază H decât RTaza-MoMLV, a cărei moleculă este formată dintr-o singură subunitate polipeptidică de 71 kDa. Ambele sintetizează cele două catene ale ADNc și produc extensia primerilor, servind pentru secvențializarea ARN sau pentru obținerea unor sonde marcate direct prin RT-PCR. Uneori, RTaza AMV se poate folosi în locul polimerazei Klenow, dacă activitatea acesteia în reacția dată nu este satisfăcătoare. O unitate enzimatică corespunde cantității de proteină care catalizează încorporarea a 1 nM dTTP într-un produs acidoinsolubil, pe parcursul a 10 min de incubație la 37°C, în tampon Tris.HCl 50 mM pH 8,3 cu KCl 40 mM - MgCl_2 7/8,25 mM - DTT 10 mM - serumalbumină bovină 0,1 g/ml - dTTP radiomarcant 0,5/1 mM folosind ca matriță/primer $rA_{400}:dT_{50}$ 0,025 mM.

În ultima vreme, în practica de laborator a fost introdusă o nouă enzimă, cu dublă activitate. *Tth* pol termorezistentă prezintă atât activitate ADN polimerazică-ADN dependentă, cât și activitate de revertranscriptază, fiind preferată în RT-PCR, întrucât permite efectuarea concomitentă a reacțiilor de revertranscriere (care necesită prezența ionilor Mn^{2+}) și de amplificare a ADNc rezultat (pentru care reclamă Mg^{2+}).

3.2.1.3. Deoxinucleotidiltransferaza terminală (EC 2.7.7.31) sau TDT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*) nu are nevoie de primer în sensul propriu

al noțiunii, ea acționând asupra uneia dintre catenele ADNdc. Ea este o polimerază ADN-dependentă. Aceasta catalizează aditia repetată de dNTP la capătul 3'-OH al unor oligo- și polinucleotide, cu eliberare de pirofosfat anorganic. Spre deosebire de alte ADN polimeraze, TDT nu are nevoie de matriță, ea acționând conform ecuației:



Enzima este utilizată pentru introducerea unor cozi homopolimerice la capetele 3' ale vectorilor sau pentru marcarea capătului 3' al ADN cu analogi nucleotidici.

În general, activitatea TDT, izolată de obicei din timusul de vițel, se evidențiază mai ales la nivelul nucleilor preT- sau preB-limfocitelor, în cursul imunopoiezei. S-ar părea că enzima are rol în crearea diversității somatice a genelor pentru imunoglobuline și pentru receptorii celulelor T. Are două subunități, de 8 și 24 kDa. Ca activitate se aseamănă cu ADN polimeraza β . Pentru exercitarea activității are nevoie de prezența unor ioni metalici divalenți Me^{2+} .

Unitatea enzimatică este definită ca fiind cantitatea de proteină necesară pentru transferul a 1 nM dATP la capătul 3'-OH al unui inițiator p(dT)_{50} în cursul unei ore de incubație la 60°C , în tampon cacodilat potasic 100 mM pH 7,2 cu CoCl_2 2 mM - DTT 0,2 mM.

3.2.2. ARN POLIMERAZE (EC 2.7.7.6)

Sunt enzime fie ARN-, fie ADN-dependente, care recunosc pe matriță secvențe specifice (promotori) la care se leagă. Molecula lor complexă (holoenzima) este formată din mai multe subunități, cu formula $\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$, corespunzătoare unei mase moleculare de 480 kDa; eliminarea subunității σ , care asigură inițierea corectă a transcrierii, duce la apariția „miezului”, adică a apoenzimei. S-a constatat că indiferent de specia procariotă de proveniență, ARN-polimerazele au o structură similară, prezentând unele diferențe în mărimea subunităților.

Dintre ARN-polimerazele procariote, cel mai intens a fost studiată și utilizată enzima izolată din *E. coli*. La țării ionice mari, holoenzima se comportă ca o specie proteică unică, dar la micșorarea concentrației saline apar dimeri. Subunității α nu i s-a atribuit un rol funcțional clar, deși se presupune că existența ei în dublu exemplar ar putea fi corelată cu menținerea în opoziție a celor două catene ADN pe parcursul transcrierii. Subunitatea β este direct răspunzătoare de legarea enzimei la substrat, adică rolul ei se manifestă în specificitatea de inițiere și în elongare. β' – cea mai mare subunitate a ARN-polimerazelor bacteriene – are și cea mai mare afinitate pentru matrița ADN, dat fiind caracterul ei bazic pronunțat. În sfârșit, subunitatea σ este implicată în inițierea transcrierii, dar nu ca atare, ci numai în

interacțiune cu $\alpha_2\beta\beta'$. În celulele eucariote au fost puse în evidență ARN polimerazele I, II și III, înalt specio-specifice și care transcriu eficient doar ADN omolog, respectiv ARNr, ARNm, ARNt și ARN 5S. Transcrierea poate avea loc atât de pe ADNmc, cât și de pe ADNdc. ARN polimeraza I este sensibilă la actinomicină D, care previne elongarea moleculelor, dar nu răspunde la amanitină, la care este foarte sensibilă ARN pol II. Indiferent de originea lor, activitatea ARN polimerazelor reclamă preferențial prezența ionilor Mg^{2+} , dar au nevoie și de Na^+ , K^+ , NH_4^+ .

ARN polimerazele-ADN dependente cele mai utilizate în biologia moleculară sunt cele specifice unor celule *E. coli* infectate cu anumiți fagi. Astfel, în celulele infectate cu fagul T3, care pentru multiplicare folosește aparatul enzimatic al gazdei, s-a pus în evidență un factor proteic de tip σ , determinat genetic de către fag, și care înlocuiește factorul bacterian corespunzător, cu asigurarea specificității de transcriere. Enzima determină transcrierea $5' \rightarrow 3'$. Un caz particular apare la fagul T7, la care ARN polimeraza specifică se remarcă prin simplitatea ei structurală, ce o deosebește de toate celelalte ARN polimeraze cunoscute: este un monomer cu masa de 11 kDa, care nu acționează alături de alți factori adiționali. În sfârșit, între ARN polimerazele fagice folosite în biologia moleculară este de menționat și cea corespunzătoare fagului SP6. Toate aceste trei enzime sunt capabile să sintetizeze substraturi pentru studii de prelucrare (*processing*) a transcripturilor ARN și se mai folosesc și pentru cartarea ADN genomic, din punct de vedere al prezenței exonilor și intronilor. De asemenea, ele permit sinteza unor sonde ARN pentru hibridizare sau pentru obținerea unor matrițe pentru translație *in vitro*. ARN polimerazele amintite sunt capabile să încorporeze NTP marcați.

O unitate de activitate enzimatică este cantitatea de material necesară pentru încorporarea a 1 nM NTP în formă acidoinsolubilă în 60 min, la 37°C.

3.2.2.1. PoliA polimeraza (EC 2.7.7.19) este un membru al superfamiliei nucleotidil-transferazelor. Atât enzima bacteriană, cât și cea din celule eucariote, prezintă trăsături structurale comune și anume regiunile catalitice N-terminale, domeniul de legare a ARN C-terminal și situsuri de interacțiune cu alți factori proteici. Aceste polimeraze poliadenilează capetele 3' ale ARNm, folosind ATP ca substrat. Sunt utilizate pentru marcarea 3'-OH a ARN, în scopul sintezei sondelor moleculare, adăugarea de extensii poliA la ARN sau pentru clonarea ADNc, a mesagerilor lipsiți de extensii poliA.

O unitate de activitate se referă la încorporarea a 1 nmol ATP marcat în material acidoinsolubil în interval de 10 min, la 37°C.

3.3. LIGAZE

Ligazele sunt enzime care „sudează” covalent fragmente oligonucleotidice, folosind energia eliberată prin scindarea hidrolitică a unor legături macroergice, cu apariția legăturilor fosfodiesterice între capetele 3'-hidroxil și 5'-fosfat ale

fragmentelor de acizi nucleici. În funcție de substratul pe care își exercită activitatea se deosebesc:

- ARN-ligaza (EC 6.5.1.3), care acționează pe monocatene ARN;
- ADN-ligaze (EC 6.5.1.1) pentru cea izolată din celulele bacteriene infectate cu fag T4 și EC 6.5.1.2, pentru ligaza proprie celulelor *E. coli*), care funcționează având drept substrat două capete adiacente fie din ADN:ADN, fie din ADN:ARN. După descoperirea ligazelor din *E. coli*, neinfectate sau infectate cu bacteriofagi, activități similare au mai fost observate într-o largă varietate de celule bacteriene și în țesuturile organismelor eucariote.

Ligazele cel mai bine caracterizate și care și-au găsit o largă utilizare în tehnologia ADN recombinat sunt *ADN-ligaza T4* (o moleculă monomer asimetrică, cu o masă de 77 kDa, determinată prin sedimentare, sau de 74 ± 3 kDa, determinată prin electroforeză tip PAGE) și *ADN-ligaza E. coli* (reprezentată de o moleculă monomerică elongată, cu o masă mai mică: 68 ± 7 kDa, prin gel filtrare, sau 63 ± 3 kDa, prin PAGE). Cele două ADN-ligaze se deosebesc prin tipul capetelor pe care le leagă: ADN-ligaza T4 leagă capete netede din ADNdc și capete din hibridi ADN:ARN sau din ARNdc. La rândul ei, ADN-ligaza *E. coli* „lipește” capetele coezive ale ADNdc. În general, pentru a-și manifesta activitatea, ADN-ligazele au nevoie de prezența unor cofactori, cu formarea intermediarilor de tip adenilat-enzimă, care în final duc la apariția unei legături fosfodiesterice. Ligazele din *E. coli*, *B. subtilis*, *T. thermophilus*, *S. typhimurium* etc. reclamă prezența NAD^+ . *T4* și *T7* ADN-ligazele sau cele de mamifere necesită ATP, dar pot utiliza și dATP, cu o eficiență foarte scăzută (circa 0,5% din cea cu ATP). Vitezele de reacție ale acestor enzime sunt foarte sensibile la modificările de temperatură: pentru ADN-ligaza din *E. coli* temperatura optimă este de $10^\circ\text{--}15^\circ\text{C}$ când acționează la capete coezive. *T4* ADN-ligaza (adică cea din *T. thermophilus*) se aseamănă cu enzima din *E. coli*, dar temperatura sa optimă este în domeniul $24^\circ\text{--}37^\circ\text{C}$ pentru capetele coezive și $65^\circ\text{--}72^\circ\text{C}$ pentru închiderea unor creștături. La rândul ei, ADN-ligaza T4 are un optim la 4°C pentru capetele coezive, 25°C pentru capetele netede și 37°C pentru închiderea creștăturilor. Pentru exercitarea activității lor, ADN-ligazele au nevoie de prezența ionilor Mg^{2+} , în timp ce legarea ADN:ARN se desfășoară cu eficiență crescută doar cu ioni Mn^{2+} . Valoarea optimă a pH pentru ADN-ligaza T4 sau cea din *E. coli* este de 7,5–8,0 în tampon Tris.HCl sau 8,0 în tampon fosfat sodic, activitatea fiind dependentă de respectarea acestor valori.

O unitate Weiss pentru T4 ADN-ligază este definită drept cantitatea de enzimă necesară pentru cataliza schimbului a 1 nmol ^{32}P din ^{32}PP la ATP, într-un material absorbabil pe Norit, pe parcursul a 20 min, la 37°C . De obicei, se consideră că 0,01 unități Weiss catalizează ligarea într-un interval de 20 min, la 16°C a peste 95% din fragmentele rezultate prin hidroliza cu *Hind* III a 1 μg ADN fag λ .

În ceea ce privește ARN-ligaza, molecula ei monomerică are o masă apreciată la circa 48 kDa, prin sedimentare și gel filtrare, sau ceva mai mică (41–45 kDa), prin PAGE. Ca substrat preferă ARNmc sau ARNdc sau ADN, în prezența ATP, Mg^{2+} (Mn^{2+}). Se folosește în sinteza oligomerilor ribonucleotidici sau pentru modificarea

unor molecule preexistente. Ea acționează doar pe molecule monocatenare; este utilizată atât pentru ligarea acizilor nucleici monocatenari sau pentru 3'-marcarea ARN, cât și pentru circularizarea oligonucleotidelor ARN sau ADN.

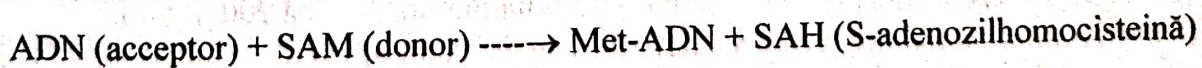
Unitatea de T4 ARN-ligază catalizează formarea a 1 nmol de 5' [^{32}P]rA₁₄₋₂₀ ca produs acidinsolubil, în 30 min, la 37°C, atunci când se lucrează într-un volum de 30 μl , cu tampon Tris.HCl pH 7,8 cu MgCl_2 10 mM - DTT 5 mM - ATP 1 mM.

Între ligazele introduse în ultima vreme se numără și cele izolate din bacteriile termofile *Pyrococcus furiosus* și *Thermus thermophilus*, respectiv *Pfu* și *Tth* ligazele, care catalizează reacția de formare a legăturilor fosfodiesterice la temperaturi ridicate (la 45°–80°C și respectiv la 37°–70°C). Ambele enzime au aplicații în LCR (*ligase chain reaction*), tehnică de amplificare a ADN folosită pentru detectarea unor cantități extrem de reduse ale anumitor secvențe cunoscute de acid nucleic. 1 U activitate pentru aceste două enzime corespunde aceleiași cantități de material care permite ligarea completă a 0,5 μg ADN Bluescript® crestat, în 15 min, la 55°C, în tampon Tris.HCl 20 mM pH 7,5 cu KCl 20 mM - MgCl_2 10 mM - Nonidet P-40 0,1% - NAD^+ 0,1 mM - DTT 1 mM.

3.4. ALTE ENZIME

3.4.1. ADN METILTRANSFERAZE (EC 2.1.1.72 ȘI EC 2.1.1.73)

Sunt enzime care catalizează transferul grupării S-Met de la S-adenozilmetionină (SAM) la dA (la gruparea 6-NH₂) și respectiv dC (la N⁴ sau C⁵) dintr-o secvență dată de ADN. În general, această reacție este ireversibilă. Enzimele menționate au specificitate de secvență, dar cele provenind din celulele de mamifere sunt mai puțin restrictive ca cele bacteriene și sunt mai ales dC specifice. La bacterii, situsul de recunoaștere pentru metilaze are 4–8 perechi de baze, pe când la mamifere este reclamat în mod special dubletul CpG. De multă vreme este cunoscut faptul că 2–10% din bazele ADN celular sunt metilate. La procariote, metilarea anumitor secvențe face genomul respectiv refractar la acțiunea enzimelor de restricție corespunzătoare, cu apariția menționatului fenomen de restricție-modificare (R-M). În celulele de mamifere, metilarea C este implicată în transcrierea genelor (producând modificări epigenetice), precum și în inactivarea cromozomului X. Nu se cunoaște mecanismul, dar la bază stă ecuația:



ADN acceptor poate fi – în mod natural – de tip cromozomal, iar *in vitro* s-a obținut metilarea unor ADN plasmidiali, fagici sau a unor oligonucleotide.

Se cunosc trei tipuri de metilaze implicate în sistemele R-M, majoritatea în tandem cu enzime de restricție:

– tip I – care necesită prezența $\text{Mg}^{2+} \approx 5 \text{ mM}$ și a ATP 100 μM ;

– tip II și III – care nu reclamă prezența Mg^{2+} , dar existența Co^{2+} stimulează metilazele din celulele de mamifere.

Tăria ionică necesară bunei funcționări a acestor enzime se determină empiric, dar în general corespunde celei pentru restricțaza din sistem și se asigură cu NaCl sau KCl, iar pH optim este în jur de 7,4, în tampon Tris 50 -100 mM - 2-mercaptoetanol 5 mM (sau DTT 1 mM) - serumalbumină bovină 100 μ g/ml, la 37°C, timp de 1–2 ore.

Spre deosebire de endonucleazele de restricție de tip II, metiltransferazele prezintă similarități marcate ale suportului proteic, mai ales în ceea ce privește 5-metiltransferazele. Au fost descrise câteva familii de metilaze, la care s-a descris o structură analoagă, întărită de motive înalt conservate de aminoacizi. Domeniul de recunoaștere a țintei a fost localizat în zona de variabilitate maximă a secvenței, aflată în apropierea centrului moleculei. Segmentele polipeptidice omoloage au fost identificate și în familia N^6 -metiladenintransferazelor, cu definirea unui motiv consens, mai redus ca domeniu, comparativ cu 5-metilcitozintransferazele. Mecanismele de metilare ale celor două tipuri enzimatică diferă, întrucât primele se adresează unor grupări $-NH_2$ exociclice, iar celelalte acționează asupra unui atom de carbon din heterociclu. În cazul metiltransferazelor de tip II s-a elaborat un model de evoluție implicând duplicarea genei, urmată de o evoluție divergentă a segmentelor duplicate.

Exprimarea genelor care codifică pentru enzimele din sistemele R-M de tip II se află sub control foarte strict, care – se pare – că include și participarea unui ORF adițional clusterului de gene R-M, exprimând o proteină de control. Uneori, metilarea exociclică a carbonului poate avea drept consecință o deaminare, ceea ce produce o mutație spontană, 5-metilcitozina fiind recunoscută pentru potențialul său mutațional.

Unele enzime din sistemele R-M de tip II – denumite de tip IIS – recunosc secvențe asimetrice de 4–7 pb (v. acolo), hidroliza având loc la 1–20 pb mai departe. S-a pus problema mecanismelor de modificare prin metilare, care evită „sinuciderea” bacteriei gazdă, constatându-se existența a două domenii independente N^6 -metiladenină, specifice pentru fiecare catenă ADN. La alte sisteme, pe o catenă este metilată citozina, iar pe cealaltă adenina.

Pentru metilaza *Eco* RI, definiția unei unități corespunde unei cantități de enzimă necesară pentru a asigura protecția > 90% a 1 μ g ADN fag λ față de restricția cu endonucleaza *Eco* RI, după incubare de 60 min, la 37°C, în tampon Tris.HCl 100 mM pH 8,0 cu EDTA 10 mM - SAM 100 μ M - serumalbumină bovină 100 μ g/ml.

3.4.2. PRONAZĂ E (EC 3.4.24.31)

Este numele dat unui grup de circa 10 proteaze din *Streptomyces griseus* K-1 (incluzând 5 serinproteaze, 2 Zn^{2+} -endopeptidaze, 2 Zn^{2+} -leucinaminopeptidaze și o Zn^{2+} -carboxipeptidază) și are o largă specificitate pentru hidroliza completă a

proteinelor, la pH 7,0–8,0, motiv pentru care este folosită obținerea și deproteinizarea (cel puțin parțială) a ADN. Prin gel filtrare s-au evidențiat componente cu o masă de 15–27 kDa. Întrucât pronaza comercială poate conține urme de DNază, anterior stocării la $-20^{\circ}C$ sau folosirii, se impune incubarea enzimei fie 10 min, la $80^{\circ}C$, fie 15 min, la $56^{\circ}C$ și alte 60 min, la $37^{\circ}C$, pentru anihilarea activității endonucleolitice. Incubația probei cu pronază se realizează la $37^{\circ}C$, obligatoriu în prezența unui detergent cum ar fi DDS 0,5–1%.

3.4.3. PROTEINAZĂ K (EC 3.4.21.64)

Este o serinprotează foarte stabilă din fungul *Tritirachium album*, prezentând o largă specificitate în tăierea legăturilor peptidice C-terminale, mai ales la alanină. A înlocuit aproape complet pronaza în operațiunile de izolare a ADN de diferite proveniențe, eficiența ei de hidroliză fiind mult mai mare. Determinările de masă moleculară au dat rezultate variabile ($18\,500 \pm 500$ Da prin gel filtrare, 27 kDa prin PAGE sau 29 kDa pe baza dimensiunilor genei). pH optim al enzimei este în domeniul 7,5–12,0, dar de obicei se lucrează la valori 7,5–9,0, în prezența detergentilor ionici (DDS 0,5%) sau neionici (Triton X-100 1%).

Unitatea enzimatică este reprezentată de acea cantitate care hidrolizează caseina pentru a produce o absorbție echivalentă pentru 1 μg tirozină după o incubare de 1 min, la $37^{\circ}C$, în tampon Tris.HCl 50 mM pH 7,5 cu $CaCl_2$ 5 mM. Enzima se utilizează pentru izolarea ADN cromozomal de dimensiuni mari (mai ales cel folosit pentru electroforeză în câmp pulsator), pentru obținerea „amprentei” (*fingerprint*) proteinelor, pentru îndepărtarea nucleazelor din preparatele ADN și ARN.

3.4.4. FOSFATAZE ALCALINE (EC 3.1.3.1)

Numite și fosfomonoesteraze ele catalizează în mod nespecific hidroliza grupărilor fosfat de la capătul 5' al catenelor ADN sau ARN sau din ribo- și deoxiribonucleotidtrifosfați, lucrând la $pH > 7,0$. Cea mai utilizată provine din mucoasa intestinală de vițel (CIAP – *calf intestinal alkaline phosphatase*), dar se izolează și din *E. coli* (BAP – *bacterial alkaline phosphatase*). CIAP este o glicoproteină dimeră de 100–140 kDa, cu subunități identice sau foarte puțin diferite și conține patru ioni Zn^{2+} . Subunitățile BAP sunt ceva mai mici (67–110 kDa, dar de obicei 80 kDa). La $pH < 3,0$ ionii divalenți se pierd. Enzimele acționează pe substraturi variate, de la fosfoesteri ai alcoolilor primari sau secundari, zaharuri, fenoli, la nucleotide și acizi nucleici; pentru exercitarea acțiunii aceste enzime reclamă prezența unor ioni divalenți (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} etc.). Dacă substratul este ARN, CIAP poate hidroliza din nucleozide și 2'-, 3'- sau 5'-fosfați. Ionii Mg^{2+} stimulează activitatea fosfomonoesterazică în dauna activității pirofosfataze, pe care o mai poate prezenta această enzimă.

Conform uneia dintre definiții, o unitate enzimatică este acea cantitate de material necesară pentru a hidroliza 1 μM de *p*-nitrofenilfosfat într-un minut de incubare la 25°C, în tampon Tris 50 mM pH 8,0, în prezența MgCl_2 5 mM - ZnCl_2 0,02 mM.

CIAP este utilizată atât pentru prevenirea recircularizării vectorilor tăiați cu o singură enzimă de restricție, cât și pentru evitarea legării la alte molecule de acizi nucleici cu capete fosforilate, întrucât hidrolizează grupările 5'-P de la ambele capete ale fragmentului. De asemenea, se mai folosește pentru îndepărtarea capetelor 5'-P anterior marcării lor terminale cu T4 polinucleotidkinază sau, după activare, ca enzimă-reporter în sistemele de detecție prin chemoluminescență.

3.4.5. POLINUCLEOTIDKINAZĂ SAU PNK (EC 2.7.1.78)

ATP-5'-defosfopolinucleotid-5'-fosfataza catalizează transferul grupării γ -fosfat de la un rest 5'-nucleotidtrifosfat la 5'-OH liber al unui polinucleotid (ARN, ADN), pentru a forma molecule 5'-fosforilate și (deoxi)nucleoziddifosfați. Activitatea a fost identificată în celulele de *E. coli* infectate cu fagi T2, T4, T6, dar a fost observată și în celulele mamiferelor, unde enzima este activă doar pe ADN. În biologia moleculară, activitatea kinazică servește pentru modificarea moleculelor oligo- sau polinucleotidice pentru manipulări ulterioare sau pentru radiomarcare prin schimb izotopic, fără îndepărtarea prealabilă a grupărilor 5'-fosfat.

T4-PNK este un tetramer cu subunități identice, având o masă de 140 kDa prin gel filtrare sau 143 kDa prin centrifugare. Reacția de transfer a grupării 5'-fosfat la 5'-OH al moleculei acceptoare este reversibilă în prezența unui nucleoziddifosfat. Enzima prezintă și activitate 3'-fosfatazică. Ca donor de grupări fosfat se poate folosi orice (d)NTP, dar randamentul este mai bun pe ATP (uneori C, U, G, dATP, dTTP); prezența grupărilor sulfhidrilice este esențială și poate fi asigurată cu DTT 5 mM sau 2-mercaptoetanol sau cu glutation 10 mM, iar adăugarea PEG 8 000 mărește eficiența. PNK poate fi utilizată și pentru fosforilarea linkerilor, anterior reacțiilor de ligare.

Unitatea de activitate corespunde cantității enzimatică necesare pentru cataliza transferului (sau incorporării) a 1 nM ^{32}P de la capătul 5' al $\gamma[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ la capătul 5'-OH al unui oligonucleotid în 30 min, la 37°C, în tampon Tris.HCl pH 7,5 cu MgCl_2 10 mM - DTT 5 mM - $\gamma[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 0,1 mM - capete polinucleotidice 5' OH 0,5 mM. Păstrată la -20°C într-un tampon apropiat cu fosfat potasic conținând DTT 2 mM, cu 50% glicerol și Triton X-100, enzima este stabilă circa 18 luni.

3.4.6. TOPOIZOMERAZĂ I (EC 5.99.1.2)

Această enzimă, folosită adesea, este izolată din germeni de grâu. Ea relaxează moleculele ADN supraîncolăcite, inițiază creștături tranzitorii și reface legăturile fosfodiesterice în conformația ADN CCI (*cerc covalent închis*). Activitatea

enzimatică este independentă de orientarea superhelixului. Topoizomeraza I este utilizată pentru analiza gradului de supraspiralare a moleculelor ADN, pentru convertirea ADNmc complementar în ADNdc, forme circulare, ligarea creștăturilor în ADNdc. 1 unitate enzimatică convertește 1 μ g ADN plasmidial pGEM9Zf (-) în forma relaxată, în 30 min, la 37°C.

Trebuie menționat că deseori se lucrează cu enzime „inginerizate”, adică enzime care se izolează din celule procariote sau eucariote, iar – în urma prelucrării – își sporesc eficiența de acțiune sau enzime cărora le-au fost modificate proprietățile native (cerințele de ioni, cofactori, temperatură, timpi de incubare etc.).

VECTORI

Vectorul sau *vehiculul* este reprezentat de o moleculă ADN cu proprietatea de replicare autonomă față de cromozomul celular, proprietate care trebuie să se manifeste și atunci când în molecula respectivă se inserează artificial un segment de ADN neomolog, purtătorul unei informații genetice noi. Cu alte cuvinte, vectorul trebuie să fie un replicon, ceea ce presupune existența unei secvențe corespunzătoare originii de replicare *ori*, precum și a genei pentru proteina inițiator, care recunoaște *ori*. Excepție de la această regulă fac vectorii retrovirali, care se integrează în genomul celulei gazdă.

4.1. PLASMIDE

Denumirea generică de *plasmide* a fost introdusă de Ledberg și este atribuită unor molecule de ADN circular extracromozomal autoreplicative, stabile, identificate în mai multe bacterii și în câteva specii de eucariote inferioare. Stabilitatea plasmidelor sugerează că ele codifică funcții implicate în propria replicare și segregare în celulele-fiice pe parcursul diviziunii celulare. În mod normal, o plasmidă nu este indispensabilă celulei-gazdă, dar unele dintre ele conțin gene care pot fi esențiale pentru supraviețuirea celulei în anumite condiții de mediu.

În 1959, japonezii Ochiai și Akibe au relatat despre rezistența bacteriilor enterice la unele antibiotice, proprietate care a putut fi transferată în laborator altor tulpini bacteriene enterice, sensibile. Câțiva ani mai târziu, Watanabe a descris existența unor factori de rezistență transmisibili, așa-numiții factori R. Plasmidele R, izolate inițial din *Shigella dysenteriae*, au fost identificate ulterior și în specii de *Salmonella*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphilococcus*. Atât factorii R, cât și cei F (de sex) sau alte componente celulare nesupuse controlului genetic cromozomal, au fost cuprinși sub denumirea globală de *plasmide*.

Cu privire la natura plasmidelor există două teorii majore:

a. plasmidele sunt considerate ca o „completare” a genomului celulelor în care se găsesc, contribuind în proporție de 1–3% la informația genetică și furnizând gazdei elemente necesare supraviețuirii într-un mediu anumit;

b. plasmidele sunt particule subcelulare independente de genom, dar asemănătoare virusurilor; teoria se bazează pe capacitatea plasmidelor de a se replica autonom față de cromozomul celular.

4.1.1. PROPRIETĂȚILE PLASMIDELOR

Cele mai multe plasmide R constau din două segmente continue de ADN; unul dintre ele – denumit RTF (*resistance transfer factor*) – este purtătorul informației pentru reglarea replicării ADN și a numărului de copii, pentru genele de transfer și – uneori – pentru gena de rezistență la tetraciclină (*tet*). Celălalt segment – denumit *determinant r* – are dimensiuni variabile și codifică markeri de rezistență la alte antibiotice. Se cunosc și plasmide mici *drug-resistant*, care deși conțin gena *tet*, nu au capacitate de transfer; totuși ele pot fi utilizate în tehnologia ADN recombinat (de exemplu, *pSC101* cu masa moleculară $5,8 \times 10^6$ Da). Cele două componente ale plasmidelor R sunt reminiscențe ale celor de tip F, dar gena de rezistență nu a fost achiziționată prin integrarea RTF urmată de o excizie aberantă, ci prin inserția transpozoniilor.

Plasmidele F sunt molecule de ADN care conțin secvențele de interes IS2, IS3 și $\gamma\delta$, regiuni denumite *transpozoni*. Aceste plasmide au proprietatea de a se integra în cromozomul bacterian, generând celule *Hfr* (*high frequency recombination*), integrarea făcându-se la mai mult de 20 de situsuri, în oricare dintre orientări. Plasmidele pot fi captate sau pierdute, fără efect letal pentru bacteria-gazdă. În plasmide există gene suplimentare, fără echivalent în cromozom, care îmbogățesc arsenalul de apărare a bacteriei, făcând-o mai rezistentă la agenții fizici și chimici din mediu.

Cohen (1976) a clasificat plasmidele în funcție de proprietățile lor biologice în nouă categorii (induc rezistență la antibiotice, la metale grele sau la UV, produc enterotoxine, determină restricție și modificare prin enzimele pe care le codifică etc.), care la rândul lor pot fi grupate în două tipuri majore:

- *conjugative* (masă moleculară mare $17-200 \times 10^6$ Da), autotransmisibile de la o celulă la alta; în general, se află în celula bacteriană sub forma unor copii unice;
- *neconjugative* (masă moleculară $0,5-15 \times 10^6$ Da), în copii multiple; nu au capacitatea de a conjuga și prezintă interes pentru tehnologia ADN recombinat.

Fiind caracterizate prin autonomie de replicare, plasmidele utilizează unele elemente funcționale ale celulei în care se află (de exemplu, aparatul enzimatic), dar totodată oferă celulei o serie de servicii, așa cum s-a menționat.

Există trei aspecte ale replicării plasmidelor care au importanță în utilizarea lor ca vectori:

- numărul de copii de plasmide/cromozom;
- dimensiunea regiunii esențiale pentru replicare și partiție;
- fenomenul de incompatibilitate plasmidială.

Deși endosimbionți, fiecare tip de plasmidă are propriile gene pentru reglarea sintezei și a numărului de copii/celulă (1–2 pentru plasmidele stringente, care impun reguli stricte de partiție, și 10–100 pentru cele relaxate, mai puțin constrânse din acest punct de vedere). Partiția, adică distribuirea copiilor plasmidelor în mod uniform în celulele-fiice, este condiționată de unele proteine aflate la suprafața peretelui celular. Gelfand și colab. (1978) au arătat că numărul de copii este reglat de un factor plasmidial specific, care reprezintă replicarea. Probabil, acest număr este legat de afinitatea unui represor pentru situsul său de legare. În absența represorului, funcțiile necesare replicării, codificate de celula-gazdă, devin factorul limitant. Studiile au arătat că nivelul maxim de ADN plasmidial într-o celulă poate reprezenta 30–40% din ADN celular total, în timp ce experimentele efectuate pe culturi bacteriene la scară industrială au dovedit că numărul de copii este determinat de mediul de cultură. Când o bacterie se regenerează din sferoplaști, partiția se face în mod dezordonat, din cauza lipsei componentelor de perete celular care să asigure o partiție normală.

Pentru autonomie, *ori* este esențială. În general, o plasmidă conține numai o singură origine de replicare, împreună cu toate elementele sale asociate în *cis* (întreaga unitate genetică fiind definită ca replicon). Foarte rar, plasmidele generate prin fuziune vor constitui mai mult decât un replicon, dar – în aceste cazuri – numai unul dintre ei este activ. Originea replicării este o zonă de circa 100 de perechi de baze, cu o conformație cruciformă, specifică pentru recunoașterea de către elementele cu care interacționează (fig. 14). Replicarea plasmidelor este controlată de un inițiator și de un represor. Gena *rep* controlează replicarea, iar gena *cop* (*rop*) asigură numărul de copii și partiția lor în celulele-fiice; aceștia determină sinteza unui represor care acționează asupra genei *rep*, ceea ce are ca efect inhibarea replicării. Oprirea replicării este determinată de represor, care exercită un reglaj negativ, iar inițierea procesului este sub controlul inițiatorului, care asigură reglajul pozitiv.

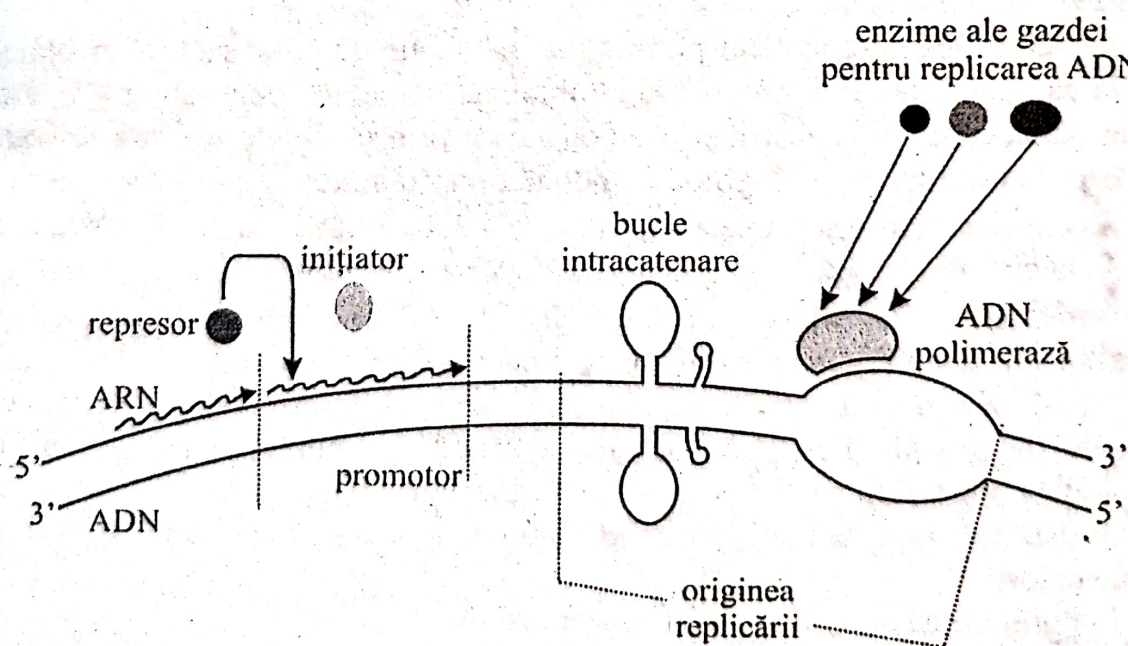


Fig. 14 – Structura originii de replicare a plasmidelor.

Zona moleculară implicată în replicare, incluzând și originea, are o secvență de circa 1 000 pb și constituie „unitatea de replicare” (*replication drive unit*). Dimensiunea mică a repliconului este trăsătura cea mai interesantă a unui vector de clonare, deoarece maximizează relația pasager-vector și simplifică profilul de restricție, ușurând în același timp cartarea și secvențializarea fragmentului inserat. Pentru replicarea plasmidelor nu se cunoaște un mecanism unic, dar multe dintre ele au adoptat modelul inelului rotativ.

Marea majoritate a vectorilor utilizați derivă de la plasmida *pMB1*, izolată dintr-un specimen clinic. Plasmidele cu un număr mare de copii/celulă bacteriană par a se replica de o manieră relaxată. Repliconii derivați de la *pMB1* sau *Col E1* folosesc aparatul enzimatic replicativ al gazdei (ADN polimerazele I și II, ARN polimeraza-ADN dependentă, produșii genelor *dnaB*, *dnaC*, *dnaD*, *dnaZ*).

Replicarea ca atare nu este suficientă pentru a asigura stabilitatea propagării moleculelor de ADN plasmidial în culturile bacteriene, ci ele trebuie să segreghe în celulele-fiice în cursul diviziunii, motiv pentru care au o extindere a ADN cu funcție echivalentă centromerului din cromozomii eucariotelor. Plasmidele stabile au un locus necesar partiției (*par*), situat adiacent originii de replicare, dar neasociat funcțiilor replicative. Plasmidele cărora le lipsește acest locus (defective de partiție) pot fi menținute prin selecție continuă pe un anumit mediu pentru care prezintă un marker de rezistență. În dorința de a reduce dimensiunile vectorilor plasmidiali, regiunile neesențiale pentru replicare pot fi deletate. În consecință, cei mai mulți vectori de clonare utilizați astăzi sunt *par* negativi.

Incompatibilitatea este fenomenul care nu permite ca în aceeași celulă bacteriană să se replice două plasmide diferite, cu partiție similară în celulele-fiice: una elimină descendenții celeilalte. Au fost descrise însă bacterii cu până la opt plasmide diferite. Explicația ar fi legată de autonomia lor de replicare, deci de structurile existente în zona *ori*: dacă au mecanism comun de replicare și necesități identice, plasmidele se vor exclude una pe cealaltă.

Transferul plasmidelor de la o bacterie la alta, numit mobilizare, este condiționat de regiunea *mob* din ADN. Acest lucru a fost dovedit prin deleția nucleotidelor implicate, ceea ce a dus la stagnarea transferului automat. Pentru preîntâmpinarea hazardului, plasmidele folosite în biologia moleculară trebuie să fie *mob*⁻.

În unele cazuri, dacă recombinatul conține o genă al cărei produs de sinteză este toxic pentru celulă, este avantajoasă alegerea unui vector de clonare plasmidial având un număr mic de copii. Plasmidele sunt autotransmisibile când conțin genele de transfer *tra*, care permit producerea de pili implicați în transferul prin conjugare. Dacă o a doua plasmidă, căreia îi lipsesc genele *tra*, este prezentă în aceeași celulă bacteriană cu prima plasmidă, ea se va transfera dacă are gene *mob*.

4.1.2. VECTORI PLASMIDIALI

Majoritatea vectorilor utilizați în tehnologia ADN recombinat au la baza construcției lor plasmida *Col E1*, cu o masă de $4,2 \times 10^6$ Da, în configurație CCC/CCI (*covalently closed circle/cerc covalent închis*), existând în 20–30 copii/celulă.

Adăugarea cloramfenicolului în mediul de cultură inhibă replicarea ADN cromozomal, fără afectarea celui plasmidial; în acest mod se amplifică numai materialul extracromozomal.

Construirea vehiculelor derivate de la *Col E1* a fost elaborată de Boyer și colab. (1977). *Col E1* codifică producerea bacteriocinei colicină E1, care conferă gazdei imunitate la acest produs. Situsul pentru *Eco RI* se află chiar în această genă, ceea ce poate servi ca marker de inactivare inserțională, cu selecția transformanților obținuți. Dezavantajul constă în tehnica foarte laborioasă de selecție și în posibilitatea apariției unor mutații spontane care generează permanent bacterii rezistente la colicină. De aceea au fost construite plasmide care prezintă gena colicinei, dar care au și gena de rezistență la ampicilină Ap^r (de exemplu, RSF2124); din păcate, Ap^r este localizată pe un transpozon – *Tn3*, ceea ce constituie un dezavantaj.

Pornind de la aceste observații, a fost construită „vedeta” tehnologiei ADN recombinat și anume plasmida *pBR322*, care întrunește calitățile ideale ale unui vector de clonare. Din plasmida *Col E1* s-a reținut originea replicării, la care s-au adăugat secvențele corespunzătoare unor markeri selectivi pentru rezistența la ampicilină și tetraciclină. Acest vector are o masă de $2,6 \times 10^6$ Da (4 363 pb) și doi markeri de selecție, Ap^r și Tc^r (fig. 15). Nici una dintre aceste gene nu este localizată pe elemente transpozabile, așa încât nu poate fi cedată altei plasmide.

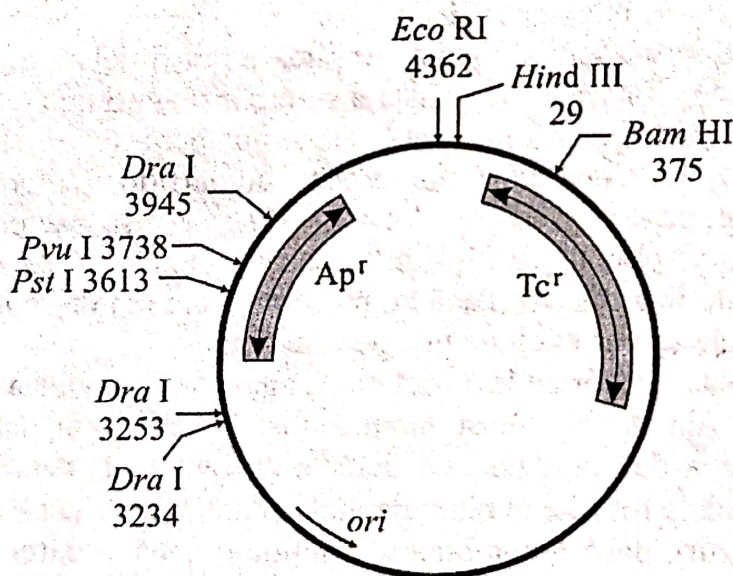


Fig. 15 – Harta plasmidei *pBR322*.

Plasmida parentală a *pBR322* este *pMB1* (8,3 kb), purtătoare a informației care codifică pentru sistemul R-M *Eco RI*, având în același timp și gena care conferă imunitate la acțiunea distrugătoare a colicinei, precum și genele și situsurile necesare replicării, partiției și mobilizării. Prin transpoziția *in vivo* a *Tn3*, din *pMB1* s-a obținut *pMB3* (12,1 kb), redusă apoi dimensional prin digestia cu *Eco RI*; în continuare, s-a efectuat o ligare, eveniment care a determinat pierderea genei Ap^r , dar a generat vectorul *pBM8* (2,6 kb), purtător al genei de imunitate la colicină și având un situs unic pentru *Eco RI*. ADN *pMB8*, liniarizat cu *Eco RI*, a fost ligat la ADN *pSC101*, digerat cu *Eco RI*. Produșii acestei reacții de ligare au

fost utilizați pentru transformarea unor bacterii, izolându-se o nouă plasmidă – *pMB9* (5,4 kb), cu gena *Tc^r*, cu imunitate la colicină și cu un singur situs de restricție pentru *Eco RI*, dar și cu situsuri unice pentru alte 6 enzime de restricție. Numărul de copii al acestor plasmide este de 20/celulă, dar poate fi crescut până la 2 000–3 000, dacă în mediul de cultură se adaugă cloramfenicol. Deoarece imunitatea la colicină nu reprezintă cel mai bun marker de selecție, în ADN *pMB9* a fost reintrodusă gena *Ap^r* (prin intermediul *Tn3*), rezultând plasmida *pBR312* (10,1 kb). La rândul ei, prin digestie parțială cu *Eco RI* și religare, aceasta a dus la obținerea *pBR313* (8,7 kb), care – printr-o nouă reducere a dimensiunii – a dat naștere la *pBR322*. Printr-o deleție derivativă și digestie parțială cu *Eco RII*, *pBR322* a generat vectorul *pBR327* (Soberon și colab., 1980). Inactivarea inserțională a markerilor și utilizarea unor segmente care conțin gene pentru producerea de colicină E1 și cloramfenicol a permis construirea altor derivați plasmidiali (*pBR324*, *325*, *328* etc.).

pBR322 prezintă situsuri unice de restricție pentru mai multe enzime: *Eco RI* (prin convenție considerat punctul 1 al hărții fizice, total descifrată), *Bam HI*, *Hind III*, *Pst I*, *Sal I*, trei situsuri pentru *Bgl I*, cinci pentru *Eco RII* etc. Dacă nu se urmărește inactivarea inserțională a nici unuia din markerii de rezistență, se recomandă utilizarea enzimei *Eco RI*. Plasmida *pBR322* este *mob⁺*, dar formează multimeri care se pierd în cursul diviziunii celulelor-gazdă, dacă nu sunt cultivate pe medii selective conținând cele două antibiotice în concentrații adecvate. Pentru a putea utiliza și situsul pentru *Eco RI* în selecția prin inactivare inserțională, Bolivar a construit *pBR325* (fig. 16).

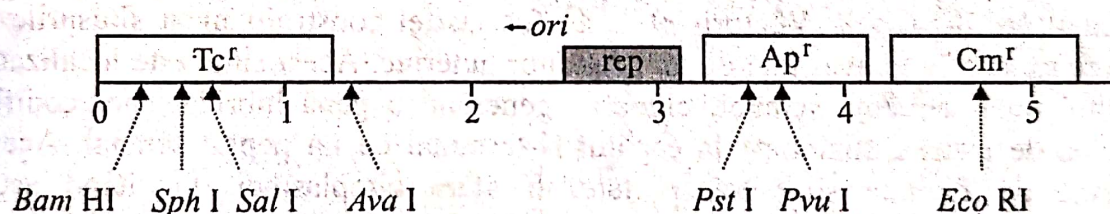


Fig. 16 – Harta plasmidei *pBR325*.

O serie de vectori au derivat și de la plasmida naturală *p15A*. Cel mai cunoscut este *ACYC184* (4 kb), care conține genele de rezistență la cloramfenicol și tetraciclină și situsuri unice de restricție pentru *Eco RI*, *Bam HI*, *Sal I* și *Hind III*. Deoarece nu este autotransmisibil și poate fi amplificat, acest vector de clonare – ca și plasmidele derivate de la *pBR322* – poate fi utilizat în studii de complementare.

4.1.2.1. Vectori plasmidiali de exprimare. Dezvoltarea unei game largi de vectori pentru transcrierea eficientă a ADN clonat permite exprimarea proteinelor heteroloage atât în sisteme procariote, cât și în cele eucariote. Dar cantitatea de proteină, precum și activitatea ei biologică depind de o multitudine de factori (stabilitate, solubilitate, mărime, modificări posttranslaționale etc.), inclusiv de sistemul de exprimare ales. În general, imunogenicitatea și antigenicitatea polipeptidului recombinat sunt mai puțin dependente de sistemul gazdă folosit. Deoarece bacteriile au o rată foarte mare de multiplicare, sistemele procariote sunt

foarte avantajoase din punct de vedere cantitativ, marea majoritate a vectorilor de exprimare plasmidiali folosind drept gazdă *E. coli*. Pentru exprimarea proteinelor recombinante există două strategii generale:

- prima constă în fuziunea în fază (*in frame*) a ADN codicator pentru proteina de interes cu anumite secvențe codificatoare bacteriene, astfel încât să rezulte proteine de fuziune. În general, în *E. coli* proteinele de fuziune sunt mai stabile și, în unele cazuri, mai solubile; vectorii de acest tip utilizează fuziunea cu β -galactozidaza, glutathion-S-transferaza, proteina A;

- cealaltă strategie implică exprimarea directă a genei străine în vectori cu promotori inductibili în prezența unei secvențe *leader* pentru inițierea eficientă a translației.

Vectorii de exprimare sunt accesibili cu sau fără semnale de inițiere, astfel că genele pot fi clonate cu secvențe semnal proprii sau cu semnale de inițiere provenite din vector. Cei de tip *pBR322* sunt foarte buni pentru inserția și clonarea genelor, dar pentru exprimare proprietățile sale nu corespund. Pentru o clonare, însoțită de o exprimare eficientă a unei gene în *E. coli* este nevoie de vectori care să conțină elementele de reglaj ale unui operon. Pornind de la acest principiu, au fost construite plasmidele din seria *pUC* (fig. 17).

Plasmidele *pUC* sunt lipsite de gena *rop* și de aceea se replică într-un număr mult mai mare de copii, purtătoare ale originii *pMB* (sau *Col E1*).

pUC9, construit de Vieira și Messing (1982), a fost obținut astfel: din vectorul *pBR322* a fost îndepărtată gena *Tc^r*, atașându-se în schimb o porțiune din operonul *lac* de *E. coli*. Vectorii *pUC* au fost astfel construiți încât situsurile de clonare să se afle în aval față de un promotor puternic. Acest situs este localizat la sfârșitul unei secvențe semnal, clonarea generând o genă hibridă, care codifică proteina de interes, fuzionată la capătul N-terminal cu un peptid semnal. Aceste proteine de fuziune sunt transportate în afara citoplasmei, facilitând astfel purificarea. Un promotor des folosit în vectorii de exprimare pentru sistemul *E. coli* este cel al bacteriofagului λ . Transcrierea din acest promotor este controlată de către produsul genei *CI*. Există o mutantă *CI* termosensibilă, care permite clonarea acestor plasmide la 30°C fără exprimarea insertului; cultivarea la 42°C inactivează represorul și exprimă proteina codificată de pasager. Exprimarea la nivel ridicat a genelor poate fi controlată și prin numărul de copii plasmidiale. În acest sens, s-au construit *runaway plasmid vectors*; la 30°C aceștia prezintă un număr mic de copii, dar la 42°C numărul lor crește de câteva sute de ori. Acest tip de replicare fiind letal pentru celulă, gazda bacteriană transformată se cultivă la temperatură scăzută, iar sinteza proteinelor este inițiată prin creșterea temperaturii.

Unii vectori de exprimare utilizează promotori *lac* sau *trp*, care pot fi controlați eficient de prezența sau absența unei molecule inductor adecvate (respectiv lactoză sau triptofan). S-au construit și promotori artificiali, fie prin fuziune cu diferite secvențe de ADN, fie prin sinteză chimică. Alte elemente care asigură exprimarea la nivel ridicat sunt semnalele pentru inițierea optimă a translației (situsul de legare pe ribozom și codonul de start).

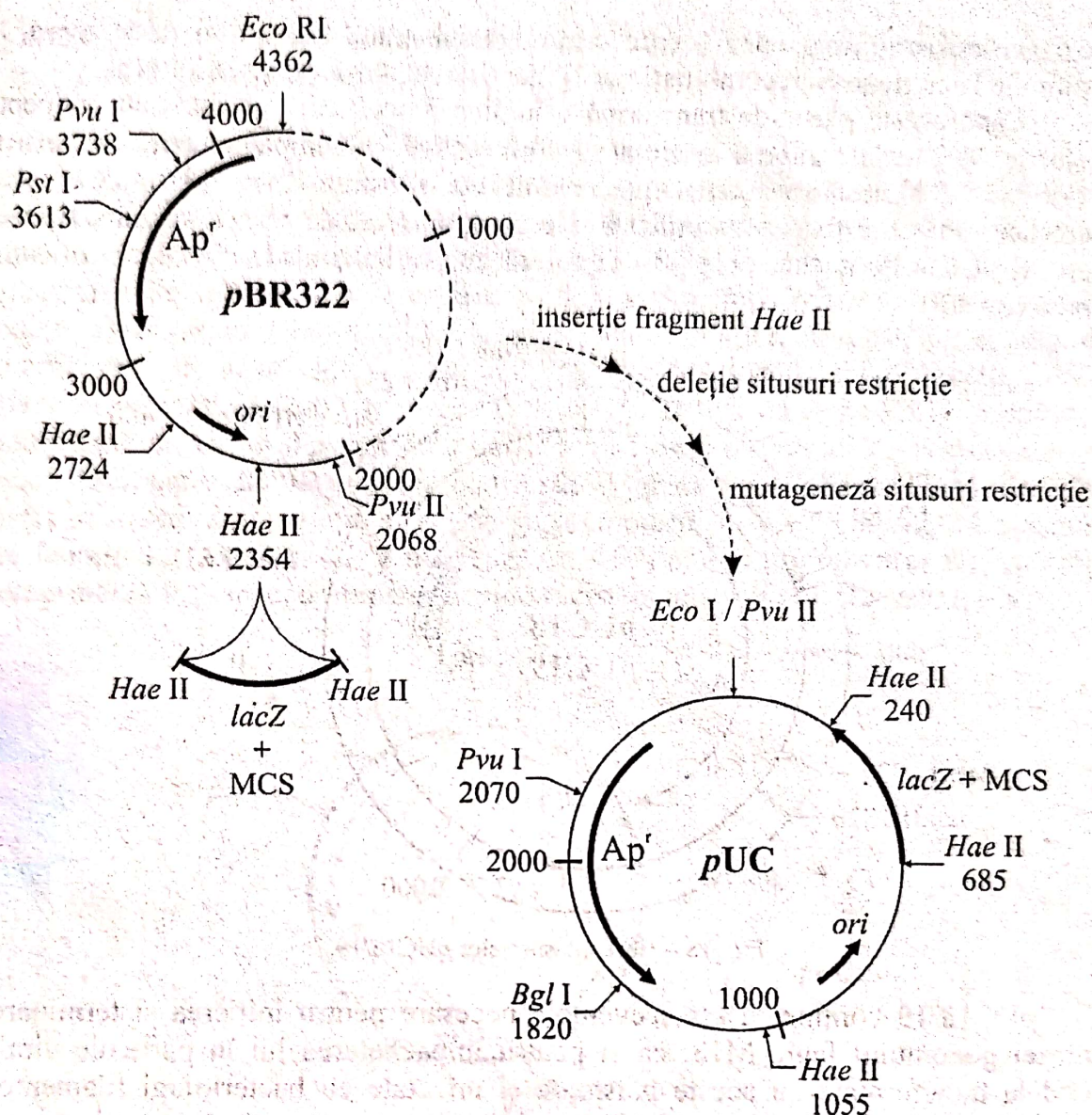


Fig. 17 – Schema obținerii plasmidelor seriei *pUC*, pornind de la *pBR322*.

Pentru a ușura inserția genei străine, precum și pentru o selecție mai eficientă a recombinanților, s-a introdus un fragment scurt de ADN sintetic (denumit polilinker sau MCS – *multiple cloning sites*), care conține secvențe unice de hidroliză pentru mai multe enzime de restricție. Între altele, MCS asigură plasarea corectă a insertului sub controlul elementelor operonului *lac*, ceea ce permite în final o exprimare eficientă. Fragmentul MCS este scurt și nu afectează exprimarea genei structurale în care este inserat (și anume gena β -galactozidazei din porțiunea de operon *lac* atașată vectorului). Inserția unui fragment exogen de ADN în polilinker duce la întreruperea informației genetice pentru β -galactozidază, care nu va mai fi sintetizată ca atare. Această pierdere se poate vizualiza cu ajutorul unui substrat cromogen denumit X-gal (5bromo-4cloro-3indolilfosfat- β -D-galactopiranozid): în absența recombinării, X-gal este hidrolizat, rezultând un derivat indolil insolubil, de culoare albastră, care se traduce prin apariția de colonii bacteriene colorate la fel. Dacă însă în polilinker a

fost introdus un insert, enzima care scindează substratul nu se mai sintetizează, iar coloniile bacteriene cu recombinări vor fi identificate după culoarea lor albă.

Când aceste plasmide transformă o tulpină *E. coli* care produce un polipeptid defectiv în β -galactozidază, enzima se formează prin complementare, cu apariția colorației albastre la creșterea pe mediul cu substrat. Între plasmidele *pUC*, perechea 18/19 este foarte des utilizată. De menționat că, de obicei, se „sintetizează” perechi *pUC*, diferite între ele prin faptul că au polilinkerul de clonare în orientare opusă (fig. 18).

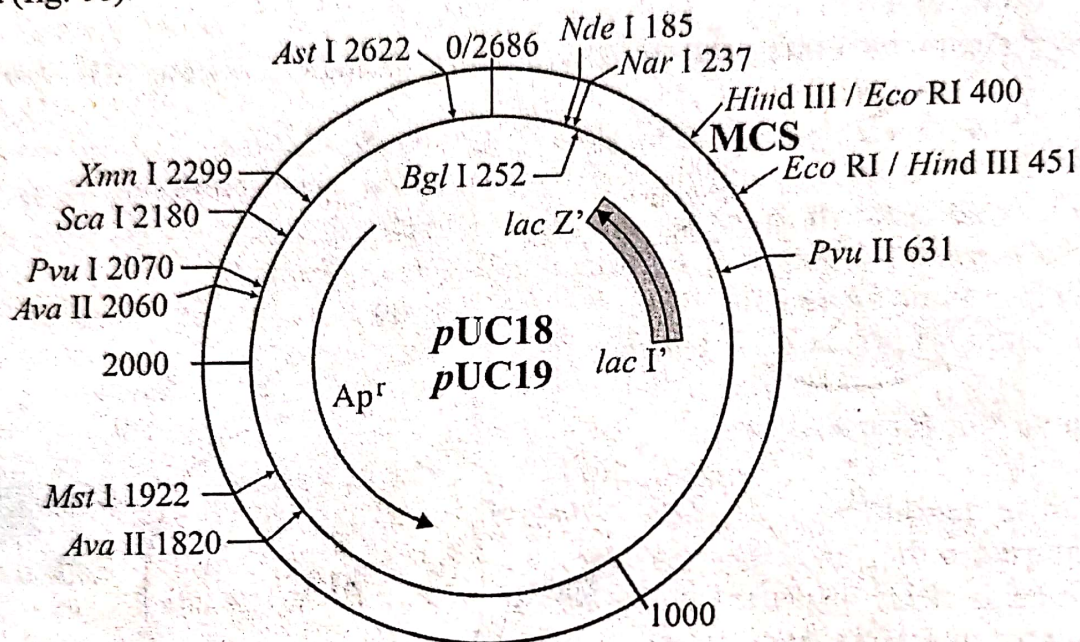


Fig. 18 – Harta plasmidelor *pUC18/19*.

pUC18/19 conține în *cis* secvențele necesare pentru inițierea și terminarea sintezei genomului fagic M13, ca și pentru împachetarea lui în particule virale. Celulele transformate cu aceste plasmide și infectate cu bacteriofagi filamentoși adecvați permit ca o copie de ADN plasmidial monocatenar să se împacheteze ca progen; după izolare, monocatena poate servi ca matriță pentru secvențializare, ca sondă moleculară sau în reacțiile de inducere a mutagenzei.

pSP6, *pSP65*, *pGEM-3Z* și *-4Z*, ca și *pGEM-3Zf(-)* sunt vectori derivați din *pUC*, purtători ai promotorilor ARN polimerazei bacteriofagice (SP6 și T7). Designul lor este astfel conceput încât să faciliteze secvențializarea. *pGEM-T* este un vector care permite clonarea produșilor reacției PCR, având extensii 3'-T, care înlesnesc ligarea la capetele 3'A ale ampliconului. Promotorii T3 și T7 flanchează MCS în interiorul căruia se găsesc secvențele codificatoare ale α -peptidului corespunzător genei β -galactozidazei. Inactivarea inserțională facilitează selecția recombinărilor prin identificarea de colonii alb/albastre. Pentru sinteza ADNmc poate fi utilă originea de replicare a fagului *f1*.

Plasmidele Bluescript M13⁺ și M13⁻ (pag. 91) conțin originea de replicare a bacteriofagului M13 inserată în orientare inversă într-un vector derivat din *pUC*, posesor al promotorilor bacteriofagilor T3 și T7. Acești vectori pot fi utilizați

pentru a genera *in vivo* ADN monocatenar sau ARN, complementari oricărei catene a ADN inserat în polilinker.

4.1.2.2. Selecția recombinărilor. Dacă vectorul conține un marker (gene de rezistență la unul sau mai multe antibiotice, gene pentru enzime responsabile de apariția unei colorații specifice la interacțiunea cu substraturi cromogene etc.), care nu a fost inactivat prin recombinare, selecția se face pe baza acestuia. Dar pentru cercetători prezintă interes selectarea rapidă a clonelor, în special din punct de vedere al obținerii bibliotecilor de gene, care implică construcția a sute de recombinanți. În acest scop, s-au sintetizat vectori de selecție directă (*direct selection vectors*). Aceștia sunt de tip *pUN121*, derivă de la *pBR322* și conțin o modificare: promotorul genei Tc^r este înlocuit cu cel al fagului λ ; transcrierea din vector este supresată de proteina codificată de gena CI a fagului. Când nu există insert în situsul de restricție al genei CI , promotorul P_L este represat, iar plasmida are fenotip Tc^s . Dacă în CI se inserează un ADN străin, represorul trunchiat permite derepresarea P_L , iar recombinatul devine rezistent la antibiotic (fig. 19).

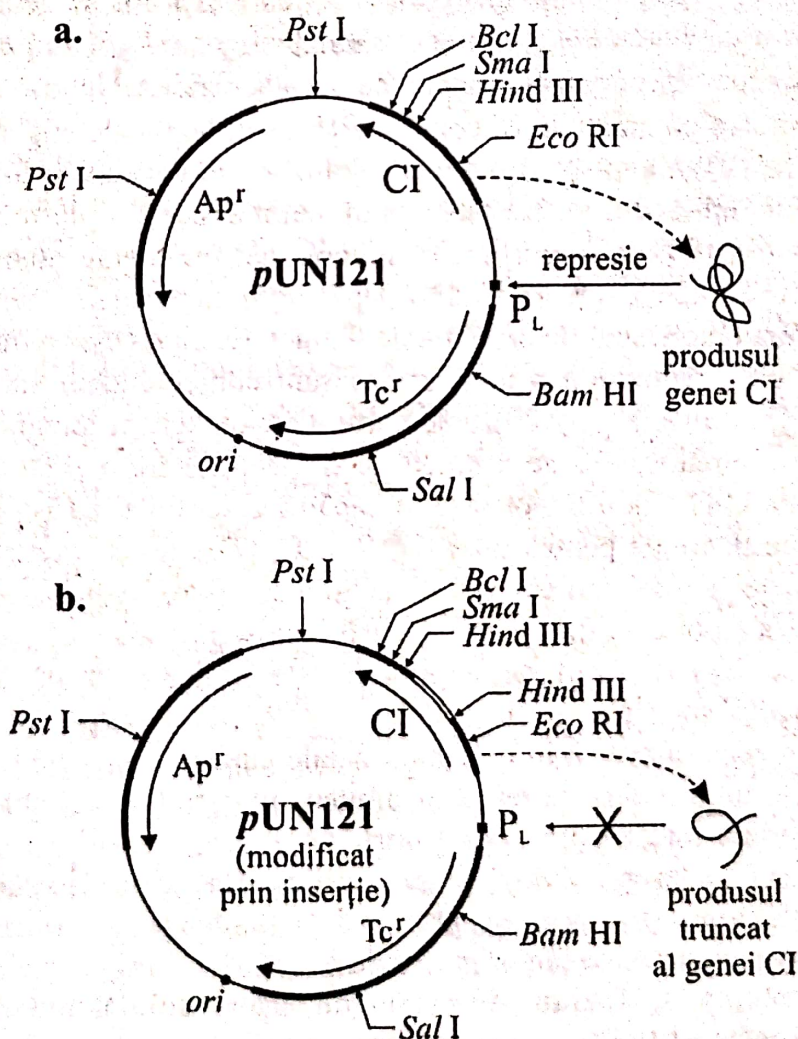


Fig. 19 – Harta unor vectori *pUN* de selecție directă.

Anumiți vectori permit clonarea selectivă a unui fragment ADN cu caracteristici particulare. Vectorii ORF sunt utilizați atunci când gena heteroloagă nu determină inactivare inserțională. În aceste cazuri, se formează gene hibride, în care prima parte aparține ADN străin, iar cea de a doua – vectorului. De exemplu, vectorul *pMR100* este un vector ORF cu promotor *lac*, care orientează transcrierea unei părți a genei CI din fagul λ , un situs de policlonare și – în afara ORF – gena *lacZ* deletată la capătul 5'. Când ADN străin inserat în MCS este corect orientat în cadru se sintetizează o proteină de fuziune, care conține regiunea N-terminală a genei CI fagice, un segment al proteinei străine clonate și regiunea C-terminală a β -galactozidazei. Celulele exprimând o proteină hibrid vor prezenta un nivel înalt de β -galactozidază, detectabilă pe plăci cu mediu adecvat (Gray și colab., 1982).

4.1.3. TIPURI DE VECTORI PLASMIDIALI DE EXPRIMARE

În continuare, se prezintă câteva exemple:

Vectorii *pUR* fac parte din categoria celor care exprimă alogena ca proteină de fuziune; ei permit clonarea insertului la capătul 3' al genei *lacZ* din *E. coli*, fapt care duce la translația unei proteine de fuziune cu β -galactozidaza, indusă cu IPTG și care păstrează activitatea enzimatică. Ei conțin originea de replicare și gena β -lactamazei (Ap^r de la *pBR322*) și sunt menținuți în tulpini gazdă purtătoare ale alelelor *lacI^r*, care hiperproduc represorul *lac*. Dezavantajul major al acestor plasmide este acela că designul a fost astfel conceput încât să conțină fragmente mari din gena β -galactozidazei (116 kDa), uneori aceasta depășind dimensiunea insertului. De aceea și răspunsul imun determinat de proteina de fuziune rezultată este redus.

Vectorii GST (glutation-S-transferază) sunt comercializați sub denumirea de vectori *pGEX* (Pharmacia) (fig.20). Fac parte dintr-un sistem integrat de exprimare, purificare prin cromatografie de afinitate și de identificare a proteinei de fuziune. Toți conțin gena GST (care fuzionează la capătul C-terminal cu gena insert), având situsuri unice de restricție pentru *Bam* HI, *Sma* I și *Eco* RI, și ca marker de selecție ampicilina. Toate aceste situsuri pot fi schimbate între vectori, astfel încât este posibilă fuziunea cu oricare dintre cele 3 ORF incluse în construct (trombină, kinază, factor proteazic Xa). Nivelul de exprimare este monitorizat de la nivelul unui promotor inductibil *tac*. Încorporarea alelei *lacI^r* 9, care hiperproduce represorul *lacI*, permite exprimarea controlată în cele mai uzuale gazde *E.coli*. GST este o proteină mică (26 kDa) și nu interferă cu reacțiile antigen-anticorp (ca proteina de fuziune A); de aceea, sistemul este recomandat pentru obținerea de anticorpi. Proteinele de fuziune GST sunt adesea solubile și se purifică din lizatul celular de *E.coli* pe coloane cu glutatión; recuperarea proteinei heteroloage ca atare se face prin proteoliză cu trombină sau cu factor proteazic Xa.

Dacă proteina de fuziune rezultată nu este solubilă, purificarea sa prin cromatografie este dificilă; în acest caz se recomandă utilizarea vectorilor *pMAL* (New England Biolab), care facilitează exprimarea insertului fuzionat cu gena

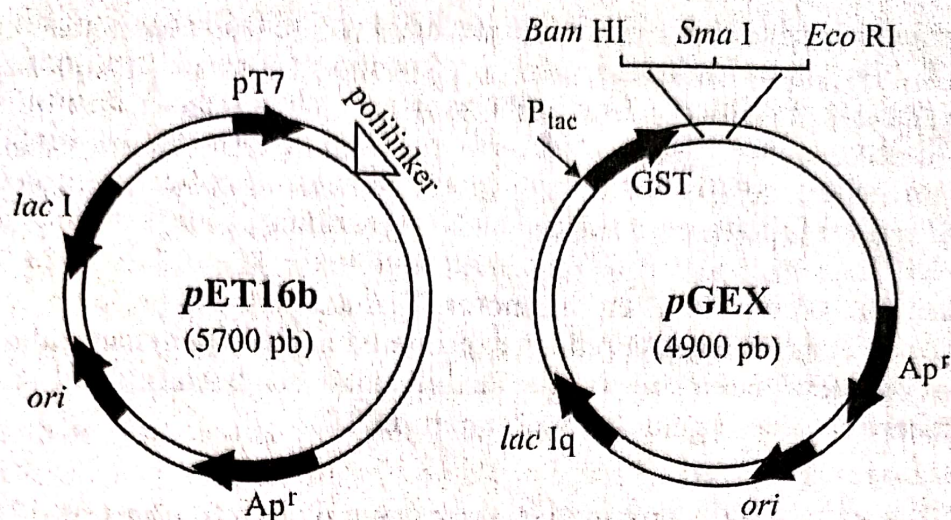


Fig. 20 – Harta unor vectori plasmidiali de exprimare.

malE (MBP – *maltose binding protein*). În constructul inițial, genele *malE* și *lacZ* fuzionează astfel încât insertul disrupe α -complementarea, facilitând selecția recombinanților; în plus, exprimarea proteinei de fuziune este sub controlul unui promotor *tac* inductibil. Afinitatea MPB pentru maltoză permite purificarea proteinei de fuziune pe coloane cu amiloză.

Vectorii *pRIT* (Pharmacia) permit clonarea insertului la secvența codificatoare a capătului C-terminal al unei proteine truncate A. Purificarea proteinei de fuziune se face prin cromatografie pe coloane cu IgG-Sepharose. Unul din dezavantajele acestui sistem este faptul că proteina de fuziune rezultată poate interfera cu interacțiile antigen-anticorp. În plus, promotorul λ P_R, utilizat pentru a induce exprimarea, este sub controlul represorului λ , mai puțin inductibil decât promotorii descriși anterior.

Vectorii Pinpoint Xa (Promega) prezintă un polilinker care face ca proteina de interes să fuzioneze în aval față de o secvență care se biotinizează în cursul exprimării în *E. coli*. Purificarea se face prin cromatografie de afinitate, pe coloane cu avidină.

Vectorii *pET* fac parte din categoria celor care permit exprimarea proteinelor națive; ei utilizează promotorul ARN polimerazei din bacteriofagul T7 pentru a facilita exprimarea la nivel ridicat a genelor clonate. În această clasă există mai mulți vectori, dar toți conțin gena Ap^r. Avantajul acestui sistem este acela că, în stocurile de *E. coli* folosite curent, nu există ARN polimeraza fagică. Pentru exprimare, plasmidele trebuie să transforme o tulpină gazdă care conține integrat în cromozomul său copia genei ARN polimerazei bacteriofagului T7 (DE3 lizogenă). Practic, utilizând un kit de lizogenie, orice tulpină bacteriană poate fi convertită în DE3 lizogenă.

Seria *pET* 3a-3c conține, în interiorul unei scurte secvențe *leader*, situsuri unice pentru enzimele de restricție *Nde* I, *Nhe* I și *Bam* HI, la nivelul cărora se face inserția ADN heterolog, astfel încât ORF corespunzător este transcris și translat sub controlul ARN polimerazei T7. Poziția situsului enzimei *Nde* I duce la fuzionarea insertului la codonul de start (ATG) al secvenței *leader*. Inserția la *Bam* HI determină translația segmentului fuzionat cu un peptid *leader* scurt (de 12 aminoacizi). A doua generație de vectori *pET* conține polilinkeri extinși, care

permit exprimarea inserților ca proteine de fuziune (*pET-17×b*). Unii dintre ei au promotori T7 *lac* modificați, ca și gena *lacI* pentru reducerea exprimării anterior inducției. Această modificare este utilă mai ales atunci când insertul codifică proteine toxice pentru gazdă. Vectorii *pET16b* conțin o secvență *leader* codificatoare pentru polihistidină, fapt care facilitează purificarea proteinei prin cromatografie de afinitate pe coloane cu Ni^{2+} (reziduurile de histidină formează chelați cu Ni^{2+}). Dacă produsul de exprimare este toxic, se pot folosi alte variante: se utilizează fie vectori *pET* cu promotor T7-*lac*, care au proteina insert sub controlul acestuia, astfel încât să reducă exprimarea în absența inductorului (IPTG), fie se induce exprimarea într-o gazdă infectată cu bacteriofagul CE6 (fag recombinat care conține și gena ARN polimerazei T7).

4.1.4. ALTE TIPURI DE VECTORI PLASMIDIALI

O primă etapă în realizarea secvențializării prevede clonarea fragmentului de analizat într-un vector adecvat. În general, este vorba de vectorii derivați de la M13, un bacteriofag filamentos cu ADN monocatenar. Între ei, se numără și *pVG404*, un vector elegant utilizat de Maxam și Gilbert. Acesta este constituit de o plasmidă de 1654 pb, purtând gena de rezistență la cloramfenicol și având un situs de restricție pentru *Sma* I flancat de două situsuri *Tth* 111-I. Perechile de baze centrale din aceste situsuri sunt A/T de o parte și G/C de cealaltă parte. Când ADN clonat este excizat din acest vector cu *Tth* 111-I, fragmentele rezultate poartă două extensii 5' diferite (cu A și cu G). Marcarea radioactivă preferențială a oricărui capăt al ADN clonat, necesar pentru secvențializarea prin metoda Maxam și Gilbert, poate fi realizată în acest caz prin adăugarea – cu ajutorul fragmentului Klenow al ADN polimerazei I – de dCTP sau dTTP marcat.

4.1.4.1. Vectori pentru bacterii Gram-negative altele decât *E. coli*. Numărul de specii bacteriene în care plasmidele pot fi menținute în condiții stabile este limitat de proprietățile originii lor de replicare. A fost descris un anumit număr de bacterii cu plasmide din grupurile de incompatibilitate P, Q și W, dar cele mai multe au 50–60 kpb, cea mai mică utilizată fiind RSF1010 (8,9 kpb). În general, plasmidele mari nu sunt folosite pentru clonare, ele neavând situsuri unice pentru enzimele de restricție. Între secvențele care nu pot fi deletate din aceste plasmide sunt cele corespunzătoare genei *mob*, care permite transferul prin conjugare. Deoarece multe bacterii Gram-negative nu pot fi transformate eficient, conjugarea este un pas esențial pentru procedurile de clonare. Specialiștii au făcut eforturi ca să construiască vectori similari celor pentru *E. coli*.

4.1.4.2. Vectori pentru bacteriile Gram-pozitive. Speciile de *Bacillus* au trezit cel mai mare interes ca gazde pentru clonarea ADN, ele fiind folosite atât în industrie, cât și în cercetările fundamentale, datorită proprietăților lor de sporulare și a secreției de proteine. Spre deosebire de *E. coli*, ele sunt acceptate ca organisme nonpatogene.

Cea mai cunoscută specie este *Bacillus subtilis*, dar în acest sistem sunt puține plasmide utilizate ca vectori de clonare; ele sunt relativ mici (2–5 kpb), existând într-un număr mare de copii. Un neajuns major pentru lucrul cu plasmidele *B. subtilis* este acela că nu se poate realiza o transformare eficientă cu ADN plasmidial monomeric. Eficiența crește fie prin utilizarea formelor multimerice, fie prin transferul ADN plasmidial în protoplaști, în prezența PEG. Dezavantajul ultimei metode constă în faptul că celulele intacte trebuie să fie regenerare din protoplaștii transformați.

Alte probleme care apar la clonarea în *B. subtilis* se referă la instabilitatea plasmidială și la nivelul ridicat al proteazelor din diferite tulpini. În consecință, multe experimente de clonare s-au realizat utilizând vectori suveică (*shuttle vectors*) pentru *E. coli* și *B. subtilis*. Etapele inițiale de clonare pot fi realizate pe gazda *E. coli*, iar clonele finale selectate pot apoi transforma *B. subtilis*. De asemenea, se comercializează vectori care permit secreția proteinelor heteroloage în *B. subtilis*.

Clonarea în *Streptomyces* este un domeniu relativ nou. *Streptomyces* sunt bacterii Gram-pozitive, cu miceliu de sporulație. Peste 60% dintre antibioticele cunoscute sunt produse de această specie. Vectorii de clonare pentru *Streptomyces* se bazează pe plasmidele naturale care se dezvoltă în acest gen. Plasmidele cu număr mare de copii provin de la plasmida p17101. Aceasta, izolată inițial din *S. lividans*, are dimensiunea de 8,9 kpb și se găsește în circa 100 de copii/celulă. Este o plasmidă autotransmisibilă care poate fi întâlnită la toate genurile *Streptomyces*. S-a descris și un vector suveică, apt de replicare în *E. coli* și *Streptomyces*. Tehnicile pentru clonarea în *Streptomyces* sunt similare celor utilizate pentru alte bacterii.

4.1.5. VECTORI SUVEICĂ (*SHUTTLE VECTORS*)

Un număr de procese tipice celulelor eucariote (transportul proteinelor, modificările posttranslaționale, *splicingul* ARN) nu pot fi studiate sau exploatate atunci când genele eucariote sunt clonate în *E. coli*, folosind vectori de exprimare. Soluția o constituie construcția de vectori care se pot replica atât în gazde bacteriene (de exemplu, în *E. coli*, având originea de replicare adecvată), cât și în celulele eucariote (în construcția lor fiind prevăzută existența originii eucariote de replicare, de exemplu *ori* SV40); acest tip de construct trebuie de asemenea, să conțină un promotor puternic – SV40 sau CMV, semnale de poliadenilare și situsuri de *splicing* pentru ARNm, *enhanceri*, precum și orice alte elemente necesare prelucrării posttranscripționale. Vehiculele acestea au primit denumirea de vectori-suveică (*shuttle vectors*). Clonarea în sistem procariot are avantajul obținerii rapide și în cantități mari a recombinatului, oferind și posibilitatea selecției sale rapide. Pentru exprimare, materialul rezultat și testat poate fi introdus în celulele eucariote. Un exemplu de astfel de vector este prezentat în fig. 21.

În designul unui vector-suveică trebuie prevăzută atât o genă de selecție în *E. coli*, cât și una pentru eucariote (de regulă cea pentru neomicinfosfotransferază), precum și un situs multiplu de clonare. Aprecierea reușitei transfecției la celulele eucariote este o operație mult mai laborioasă decât la celulele procariote, unde

prezența genelor de sensibilitate la antibiotice permite o selecție rapidă și relativ eficientă a clonelor de interes, conținând ADN recombinat. De aceea, s-au întreprins studii în vederea dezvoltării de sisteme rapide de selecție și în cazul eucariotelor. Primele experimente au folosit, pentru evaluarea eficienței transfecției, așa-numitele gene reporter, care codificau pentru enzime (β -galactozidaza, luciferaza, fosfataza alcalină) a căror activitate putea fi monitorizată biochimic; activitatea enzimatică a lizatului celular servea pentru aprecierea prezenței enzimei, implicit a procesului de transfecție.

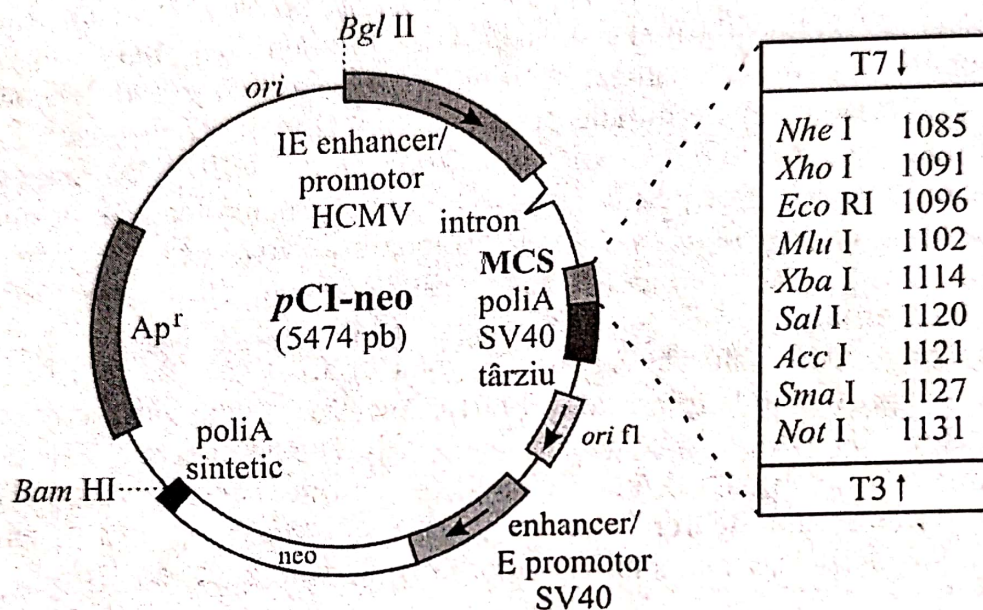


Fig. 21 – Harta unui vector-suveică.

Unii vectori de ultimă oră conțin o genă reporter care codifică pentru o proteină de fluorescență verde (GFP – *green fluorescent protein*). GFP – moleculă fluorescentă din molusca *Aequorea victoria* – are un lanț polipeptidic de 238 de aminoacizi, gruparea cromoforă fiind reprezentată de un tripeptid ciclic (Ser65-Tyr66-Gly67). Fluorescența în afara sistemului natural reclamă existența oxigenului molecular și excitarea cu lumină UV sau albastră (395 nm), emisia având loc la 509 nm. Pentru îmbunătățirea performanțelor în sistem mamalian au fost introduse modificări ale secvenței GFP; o variantă des utilizată conține două mutații ale regiunii cromofore, care deplasează picul spectral de excitare la 489 nm, ceea ce permite folosirea echipamentului de flow citometrie. Asigurarea unui nivel ridicat de expresie în eucariotele superioare a impus modificări suplimentare, așa încât noile GFP (EGFP – *enhanced GFP*) prezintă o fluorescență crescută față de original și, în plus, exhibă alte culori la emisie (galben/yellow – YFP, albastru/blue, cyan – BFP sau CFP), ușor de diferențiat în comparație cu GFP în flow citometrie sau în microscopia confocală, folosind filtre standard pentru izotiocianatul de fluoresceină.

Avantajul GFP constă în faptul că nu necesită cofactori sau substraturi adiționale, prezența sa putând fi monitorizată noninvaziv, fără liză, fixare sau distrugere celulară. Mai mult, spre deosebire de alți coloranți utilizați frecvent în

microscopia de fluorescență, GFP este relativ nontoxică, iar exprimarea sa nu afectează funcțiile celulare normale.

Firma CLONTECH a revoluționat studiile de biologie moleculară, introducând vectorii cu sistemul *Fluorescent Timer*, bazat pe modificarea fluorescenței de la verde la roșu. Modificarea culorii permite vizualizarea activității promotorului genei studiate (diferențierea între cel activ și cel inactiv, lucru imposibil de observat până acum). Fluorescența verde indică prezența materialului recent transcris, iar cea roșie denotă prezența proteinei mature. Raportul dintre fluorescența roșie și cea verde permite determinarea punctului la care activitatea promotorului studiat a încetat, ca și a modului de reglare a acestuia în cursul experimentului, în funcție de condițiile de lucru.

Un caz particular de utilizare a vectorilor GFP îl constituie vizualizarea și localizarea unor structuri subcelulare. Vectorii de localizare subcelulară codifică variante de proteine de fuziune GFP cu semnale de localizare sau proteine structurale subcelulare.

4.2. VECTORI FAGICI

Fagii (virusuri procariote) și bacteriile-gazdă corespunzătoare constituie sisteme binare de mare siguranță biologică intrinsecă. Aceasta deoarece, pentru a se multiplica, fagii au nevoie obligatorie de aparatul enzimatic al gazdei, ceea ce face să nu poată supraviețui în mediul extracelular. Pe de altă parte, se știe că fagii au două moduri distincte de creștere: unul litic – în care se comportă epizomal, și altul lizogenic – când genomul fagic este integrat în cel al gazdei, intrând într-o relație stabilă cu aceasta. Caracteristicile menționate au dus la introducerea vectorilor derivați de la bacteriofagi în tehnologia ADN recombinat.

4.2.1. BACTERIOFAGUL λ

A fost subiectul favorit al geneticienilor, realizându-se numeroase studii privind organizarea și funcționarea genomului său. Modul dual de replicare a permis izolarea unor mutante și tulpini defective din punct de vedere al anumitor funcții fagice. Fagii transduși, purtători ai unor gene de gazdă (*gal*, *bio*, *trp* sau *lac*), izolați prin excizia aberantă a genomului viral în formă de profag, au oferit cheia înțelegerii geneticii moleculare. O dată cu dezvoltarea tehnologiei enzimelor de restricție, fagul λ a putut fi adaptat pentru construcția vectorilor de clonare, fagi transduși care pot purta inserți ADN obținuți din orice sursă.

4.2.1.1. Biologia moleculară a bacteriofagului λ . Genomul fagic este împachetat într-un cap icosaedric, din care se proiectează o coadă. El codifică aproximativ 50 de gene, dar numai 50% dintre ele sunt esențiale pentru creșterea fagului și formarea plajelor. Genomul, aflat în capul particulei fagice mature, este o moleculă ADN liniară bicatenară, cu extensii de 12 nucleotide 5' monocatenare. Aceste

secvențe sunt complementare și se hibridizează, cu circularizarea genomului imediat după infecție (formându-se așa numitul *cerc Hershey*). Genele cu funcții înrudite tind să formeze clustere. Cele esențiale, care codifică formarea capului (A-F) și a cozii fagului (Z-J), precum și cele necesare asamblării ocupă treimea din partea stângă a genomului; regiunea dintre gena J și *att* (situsul de atașare) conține gene neesențiale sau cu funcții neprecizate, pe când genele situate în dreapta față de *att* codifică recombinarea situs-specifică (*int* și *xis*) și controlul lizogeniei (CIII) (fig. 22).

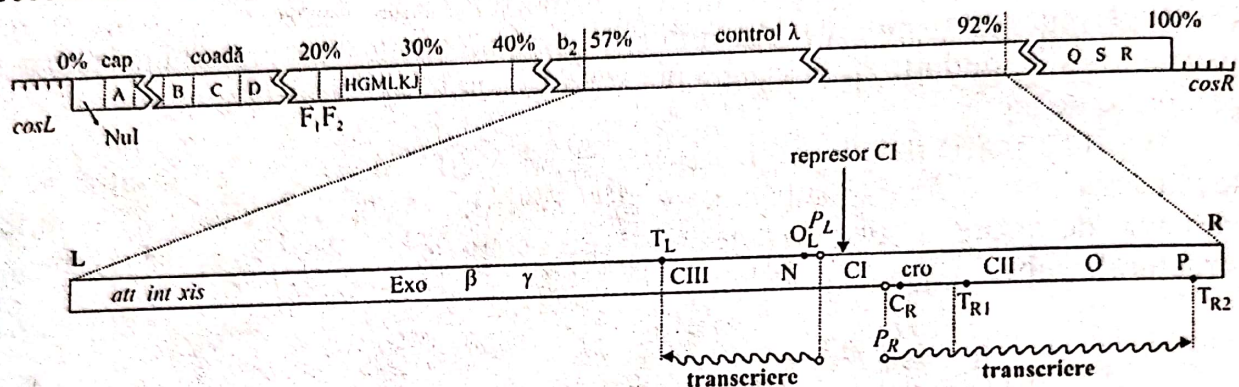


Fig. 22 – Harta genomului fagului λ.

Proteina reglatoare timpurie (codificată de gena N) este necesară activării transcripționale a celor mai multe gene fagice. Represorul CI al fagului λ comutează transcripția fagică spre lizogenie. Genele din dreapta CI sunt esențiale pentru formarea plajelor, iar prezența represorului face o celulă λ lizogenă imună la infecția cu alt fag λ, fiind responsabilă de aspectul caracteristic al plajelor. Producția genelor O și P sunt necesari pentru replicarea ADN λ, cel al genei Q, pentru activarea transcripției târzii, iar cei ai genelor S și R, pentru liza celulelor gazdă.

Adsorbția la gazdă depinde de interacțiunea între fibrele cozii – produsul genei fagice J și un receptor celular de suprafață – produsul genei *lamB* de la *E. coli*. Spectrul de gazdă este determinat de această specificitate și este important pentru alegerea tulpinii bacteriene în care se va multiplica vectorul.

În creșterea litică se face tranziția de la transcripția timpurie la cea târzie, se sintetizează proteinele virionului, iar genomul replicat este împachetat. Prin liză celulară se eliberează circa 100 de particule infectante/bacterie.

Pentru exprimarea pe parcursul ciclului litic, genomul λ conține trei promotori importanți; cei implicați în răspunsul lizogen sunt reprezentativi din punct de vedere al obținerii de vectori. Imediat după infectarea unei gazde sensibile sau după inducerea unei tulpini lizogene, începe transcrierea din promotorii P_L și P_R. Promotorul fagic P_L guvernează transcrierea timpurie a genelor din porțiunea 5' (de la gena N la *int*), fiind un „instrument” puternic a cărui activitate poate fi reglată prin manipularea represorului termosensibil. Transcriptul timpuriu al genei N este tradus într-o proteină al cărei rol îl constituie controlul asupra ARN polimerazei, ignorând semnalele de terminare a transcrierii. La anumite concentrații, produsul genei *cro* acționează la situsurile de control P_L și P_R, derepresând transcrierea din acești promotori. Cei mai mulți transcripti se termină

la situsurile T_{L1} și T_{R1} , iar cei care depășesc acest prag sfârșesc la situsul care precede gena Q (T_{R2}). Producția genelor N și Q sunt esențiali pentru dezvoltarea fagului și formarea plajelor. Situsul de terminare a transcrierii T_{R1} fiind inefficient, fagii N pot exprima genele O și P și se pot replica. Dacă situsul de terminare a transcrierii T_{R2} este îndepărtat prin inginerizare, fagul N defectiv se poate matura, formând plaje. Mulți vectori λ conțin o deleție a acestui situs, ceea ce permite clonarea unui insert ADN într-un vector λ N independent.

Genomul fagului λ se replică bidirecțional, începând de la originea de replicare din interiorul genei O, o dată cu inițierea procesului de replicare a gazdei. În primele minute după infecție, genoamele fagice se replică sub formă de molecule circulare monomerice (conform modelului θ de replicare), iar în fazele târzii, produsul predominant este genomul liniar concatemic, probabil apărut prin modelul inelului rotator. Formele intermediare ale procesului de comutare de la lizogen la litic sunt sensibile la atacul exonucleazei V din celula gazdă. Această schimbare a modului de replicare a ADN fagic coincide cu activarea genelor târzii, necesare pentru producția de proteine virale. ADN concatemic constituie substratul pentru împachetare, proces care implică tăierea a două situsuri *cos* apropiate și incorporarea genomului liniar în capul fagic. Procesul de împachetare a genomului λ reclamă dimensiuni stringente, numai moleculele cu 78–105 % din lungimea genomului sălbatic putând fi asamblate în particule viabile. Aceste restricții limitează fragmentul insert care poate fi clonat într-un vector λ la aproximativ 20 kpb.

Împachetarea *in vitro* utilizează ADN monomeric liniar, astfel încât eficiența procesului în extracte poate fi determinată prin folosirea genomului λ matur extras din capul fagului. Tulpinile necesare pentru prepararea extractului de împachetare poartă profagi mutanți în genele CI (făcându-le inductibile la temperatură) sau/și mutații ale genei S (cu funcții de liză, ceea ce face ca lizogenii induși să nu lizeze spontan, producția fagici continuând să se acumuleze pe durata câtorva ore).

4.2.1.2. Strategii de obținere a vectorilor derivați de la genomul fagului λ .

Pentru obținerea acestor vectori pot fi abordate diverse căi:

- în scopul obținerii de vectori cu înalt grad de securitate biologică, adecvați tehnologiei ADN recombinat (cu evitarea introducerii unor gene periculoase), s-a recurs la blocarea capacității de replicare lizogenă a fagului, păstrându-se doar mecanismul litic. În acest scop au fost induse mutații la nivelul genelor fagice CI (represor), CII (lizogenic), CIII (lizogenic);

- s-au eliminat situsurile de restricție aflate în regiuni implicate în ciclul de viață litică;

- s-a recurs la promovarea transducției generalizate, cu eliminarea din vector a genelor *att*, *int*, *xis*, *exo* etc.;

- împreună, vectorul și insertul nu trebuie să depășească 105% față de genomul λ^+ . Pe de o parte, 25% din ADN λ pot fi îndepărtate fără alterarea funcțiilor principale, iar pe de altă parte, un procent suplimentar de 5–10% din dimensiunea genomului nu îi modifică proprietățile.

Deoarece nici una dintre genele situate între J și N nu este esențială pentru creșterea fagului în fază litică și pentru formarea plajelor, în cazul utilizării genomului fagului λ ca vector această regiune din genom poate fi deletată și substituită cu insert.

Datorită limitelor superioare și inferioare impuse dimensiunii ADN de împachetat în fagul matur, sunt adoptate două strategii diferite pentru clonarea fragmentelor nucleotidice mai scurte sau mai lungi. În cazul vectorilor λ de inserție, care au un singur situs de restricție enzimatică într-o regiune neesențială a genomului (astfel încât inactivarea inserțională a unei gene fagice să permită recunoașterea recombinatului prin apariția unei modificări fenotipice), se poate clona un fragment ADN scurt de circa 2 kpb (dar nu mai mare de 5 kpb). Inserții mai mari de 10 kpb pot fi clonați în vectori λ de înlocuire (*replacement vector*), care permit substituirea unui fragment neesențial din genom, aflat între 2 situsuri de restricție. Ligarea este realizată la un raport vector:țintă care favorizează formarea de concatemi lungi în care alternează cele două componente. Deoarece împachetarea *in vitro* necesită prezența celor două situsuri *cos* la o distanță minimă de 38 kpb, selecția recombinanților în care ținta este flancată de vector se face automat. În cei mai mulți vectori de acest tip (spre exemplu, EMBL4), regiunea internă înlocuită de țintă conține o genă responsabilă de viabilitatea fagului într-o gazdă *E. coli* apropiată. Prin infectarea acestei gazde cu recombinatul se poate realiza selecția. Vectorii de înlocuire au avantajul că permit clonarea unor inserți mari.

Așa după cum s-a menționat mai sus, activitatea nucleolitică a *ExoV* este inhibată de produsul genei *gam* λ , al cărei rol cheie este eludat prin utilizarea gazdelor *ExoV*-deficiente. Numai genoamele fagice care posedă una sau mai multe copii ale unei octanucleotide denumite Chi sunt substraturi eficiente pentru recombinația mediată de *ExoV*. Deoarece λ sălbatic nu are aceste secvențe, vectorii EMBL și derivații lor au fost dotați cu situs Chi pe brațul drept. Unii vectori (Charon 4, Charon 4A, Charon 30 etc.) sunt *gam*⁻Chi⁺ și de aceea se recomandă utilizarea lor numai dacă biblioteca gen(om)ică obținută este amplificată în gazde *ExoV*⁻.

Strategia exprimării genelor inserate în vectori derivați de la fagul λ depinde de promotorul sub controlul căruia se află acestea. Genele clonate împreună cu propriul promotor funcțional au avantajul că pot fi amplificate într-un număr mare de copii prin replicarea ADN fagic.

Cele mai bune rezultate se obțin la inițierea transcrierii din promotorul fagic târziu P_R, care reclamă produsul genei Q (genele inserate în fagul recombinat trebuie să se afle în prima jumătate a genomului).

În concluzie, cel mai eficient sistem de exprimare genică în vectori derivați de la fagul λ se bazează pe combinarea defectului termoinductibil în CI cu modificări ale genomului prin integrare/excizie. Față de plasmide, vectorii λ conferă avantajul controlului strict, dar flexibil al eficienței promotorului propriu, ca și al numărului de copii genice. Gena clonată poate fi menținută în forma de o copie/cromozom ca profag, înainte de inducerea exprimării și a replicării la nivele ridicate, printr-o simplă modificare a temperaturii.

Vectorii fagici au fost astfel construiți încât să permită recunoașterea recombinărilor prin pierderea genelor care afectează fenotipul fagului (prin inactivare sau înlocuire). Conceptul *size-selection* nu necesită deletarea fragmentului neesențial din vector, prezența sa fiind decelată printr-un test fenotipic sau prin selecție genetică, cu distincția clară între recombinat și vectorul parental. *Screening*-ul fagilor recombinanți se poate efectua prin diverse mijloace, fie la nivelul acizilor nucleici, fie la cel al exprimării. Prin alegerea convenabilă a gazdelor și a vectorilor fagici este posibilă creșterea recombinatului în funcție de produsul de exprimare a genei clonate: fagii recombinanți, care exprimă o genă al cărei produs poate compensa un defect al gazdei, formează plaje înconjurate de un halou de bacterii din care lipsește metabolitul respectiv.

Fagii purtători ai genei *lacZ* din *E. coli* constituie un sistem de detecție foarte convenabil, folosit în prezența unor indicatori apropriați (X-gal, hidrolizat de către β -galactozidază, cu apariția unui precipitat albastru indigo). Vectorul cu gena *lacZ* intactă va da naștere unor plaje albastre pe plăcile de agar cu indicator, indiferent dacă inițial tulpinile au fost Lac^+ sau Lac^- . În schimb, recombinanții vor duce la apariția unor plaje albe pe plăci cu gazde purtătoare de deleții în gena *lacZ*.

Alți vectori de înlocuire care permit utilizarea secvenței *lacZ* sunt cei care includ genele supresor *amber* în fragmentele insert. În vectorii cu gena *supE* sau *supF* clonarea se face la situsul pentru *Eco* RI, respectiv *Hind* III; dacă tulpina gazdă conține mutația *amber* în *lacZ*, în ambele cazuri se obțin plaje albastre, în timp ce recombinanții dau plaje albe.

Procedul *screening*-ului indirect este mult mai laborios decât cele descrise anterior. În practică, testele implică recoltarea individuală a plajelor după transfecția/infecția unei gazde normale și testarea pe o tulpină de control. Câtiva dintre vectorii de tip λ conțin gene pentru operoni ai *E. coli* (*bio* sau *trp*); inactivarea sau înlocuirea acestor gene poate fi detectată prin testarea plajelor individuale din punct de vedere al capacității lor de a complementa „defectul” *bioA/trp* în tulpini *E. coli*. Pot fi detectați inserți cu dimensiuni până la 1 kpb. Modificarea mărimii recombinatului duce la alterarea densității de plutire (în gradient de CsCl), ceea ce face ca recombinanții să poată fi selectați prin ultracentrifugare.

De asemenea, se poate realiza selecția pozitivă a recombinărilor fagici. Principiul general al obținerii recombinărilor cu vectori de înlocuire constă în purificarea fragmentelor esențiale ale ADN fagic restricționat, cu îndepărtarea fragmentului central al genomului, utilizând tehnica ultracentrifugării în gradient de sucroză (după *annealing*-ul fragmentelor terminale, prin intermediul capetelor coezive ale genomului fagic). Fragmentele purificate, împreună cu fragmentul insert (pasagerul) produc un recombinat viabil.

Screening-ul se poate efectua și prin hibridizare. Plajele conținând secvențe particulare de ADN pasager pot fi selectate prin hibridizarea coloniilor cu sonde moleculare adecvate.

Deși mulți vectori de înlocuire au același design, membrii seriei EMBL3*cos* diferă prin faptul că toate genele esențiale sunt situate pe brațul drept, mai lung, aranjament care modifică parțial harta de restricție. Fragmentul *stuffer* (de

„umplutură”) este flancat de polilinkeri identici, cu orientare inversă, de până la 40 pb. În plus, unii vectori de înlocuire prezintă în structura lor promotori pentru ARN polimeraze fagice (de la T3, T7, SP6), situați în interiorul polilinkerilor. Ei permit sinteza sondelor ARN specifice pentru oricare capăt al insertului, ușurând în mare măsură „plimbarea pe cromozom” (*chromosome walking*). În polilinker vectorul EMBL3cosW prezintă terminatori de transcripție, pentru a izola genele fagice de interferența transcripțională a secvențelor de ADN clonate.

4.2.2. VECTORI DERIVAȚI DE LA GENOMUL FAGULUI λ

Acum 20 de ani s-a pus la punct o serie de modele de manipulare a situsurilor de restricție din genomul fagului λ . Pe baza cunoașterii hărții de restricție și modificare a ADN λ s-a reușit selecția *in vivo* – prin cultivarea alternativă în tulpini bacteriene care au plasmide cu situsuri de restricție de interes – a unor particule fagice care să conțină doar unul sau două situsuri pentru *Eco* RI, localizate în regiuni mai puțin importante ale genomului fagic. ADN fagic mutant a fost restricționat și împachetat *in vitro* în capsida proteică și apoi propagat în *E. coli*. După câteva cicluri succesive de digestie-împachetare-cultivare s-au obținut genoame cu anumite situsuri de restricție deletate, dar particulele fagice respective și-au păstrat capacitatea infectantă.

Astăzi se apelează la inserția unor oligonucleotide sintetice care conțin situsurile de restricție dorite. Utilizarea acestei metode a permis construirea de vectori de inserție și de înlocuire pornind de la genomul fagului λ sălbatic. Dintre cei mai cunoscuți vectori derivați fac parte:

- Sistemul λ gt (Thomas și colab., 1974) cuprinde vectori de clonare genică, derivați din genomul λ sălbatic, capabili să promoveze transducția generalizată (*generalized transduction, gt*). Acești vectori au unul sau două situsuri pentru *Eco* RI. Când există două situsuri de restricție, deleția fragmentului intermediar permite inserția unui pasager de până la 14 kpb. Deoarece vectorul crește numai pe o anumită tulpină bacteriană și numai dacă este recombinat, sistemul realizează direct selecția moleculelor recombinante. Spre exemplu, vectorul λ gt 10 de inserție a fost construit pentru clonarea unor fragmente mici, de până la 5 kpb, la un situs unic pentru *Eco* RI, în zona de imunitate. Prezintă o mare eficiență de clonare și de selecție pe *E. coli*, având o mutație *hflA150* (*high frequency of lysogenization*).

- Sistemele λ gt 11 și λ gt 18–23 sunt vectori de exprimare a ADN străin sub forma unei proteine de fuziune cu β -galactozidaza. Recombinații rezultați sunt *lac*⁻, deoarece situsul de inserție se află în *lac* Z. Vectorii λ gt 18–23 au fost construiți prin introducerea unui polilinker la situsul pentru *Eco* RI. Insertul, cu o capacitate până la 7,2 kpb, se introduce cu o anumită orientare. Printr-o mutație *amber* se intensifică acumularea intracelulară a proteinei de fuziune.

- Sistemul λ gt-WES a fost conceput de Leder și colab (1977), pentru mărirea securității lucrărilor cu vectorii din sistemul *gt*. În unele gene importante s-au introdus mutații *amber* (care nu permit supraviețuirea în afara condițiilor de

laborator). Acești vectori pot fi propagați convențional, litic sau lizogen, deoarece conțin genele *int-xis*, precum și represorul termosensibil CI 857.

– Sistemul L47, introdus de Loennen și Brammar (1980), se bazează pe construcția de vectori derivați de la genomul fagului λ sălbatic, care au însă mai mult de un situs de restricție. Un astfel de vector este L47.1, care poate fi folosit pentru substituție (cu *Eco* RI și *Bam* HI) sau pentru inserție cu *Xho* I (fig. 23).

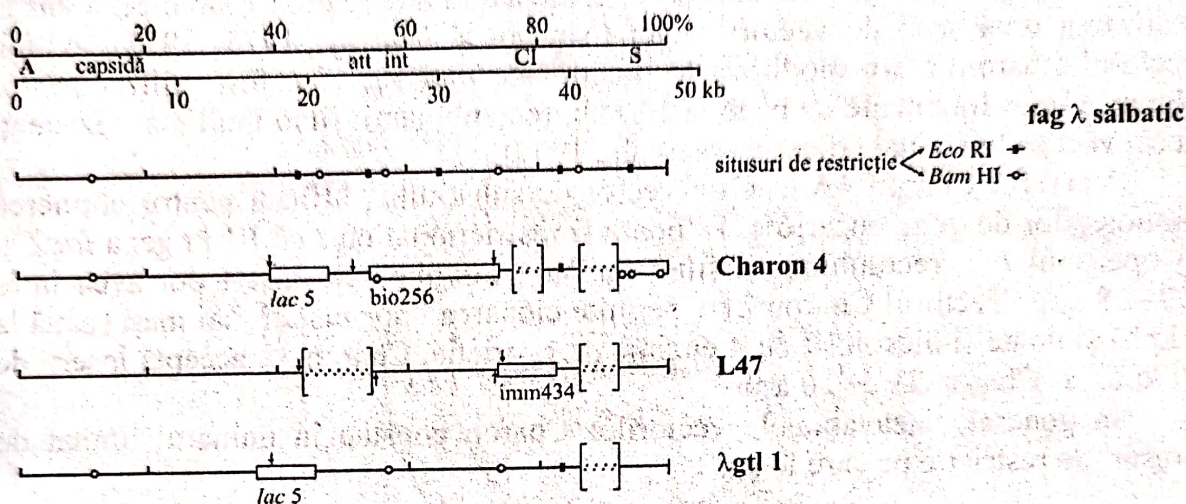


Fig. 23 – Exemple de vectori derivați de la fagul λ .

Brațele A (A') și C (C') sunt indispensabile, dar porțiunea B (B') poate fi înlocuită cu insert. Separarea fragmentelor se face prin electroforeză preparativă sau prin ultracentrifugare (cele 12 pb de la capete au tendința de formare a cercului Hershey mult mai pronunțată decât legarea la nivelul capetelor coezive, apărute după hidroliza cu *Eco* RI), segmentul intermediar fiind substituit cu gena străină.

– Sistemul λ dv. Prin excizia elementelor necesare replicării timpurii a fagului λ (circa 2 500 pb din regiunea cuprinsă în zona 78–83% a hărții) se obțin plasmide capabile de replicare autonomă, denumite plasmide d. Acestea conțin genele fagice *cro*, O și P esențiale, împreună cu gena dispensabilă CII, și se comportă ca element autoreglabil. Reglarea repliconului d este mediată de o proteină represor produsă de gena *cro*, care acționează asupra transcrierii de la poziția P_R , precum și asupra activării originii de replicare. Per celulă bacteriană se pot acumula circa 60 copii de plasmidă. Plasmida λ dv are rol istoric căci a fost utilizată de Berg și colab. (1974) pentru obținerea unui recombinat cu SV40.

– Sistemul Charon a fost dezvoltat de Williams și colab (1977), oferind o mare siguranță în exploatare. Principalele caracteristici ale vectorilor Charon sunt: introducerea unei mutații care stimulează activitatea genei N, implicată în transcrierea timpurie întârziată și în cea târzie (sunt N'); o mutație *nin5* care determină deleția regiunii T_{R2} , astfel încât transcrierea continuă până la T_{R1} ; în acest mod se asigură o exprimare puternică a funcțiilor S și R (de liză) simultan cu funcțiile genei N, iar suplimentar se reduce probabilitatea ca bacteriofagul să ajungă în stare de profag; mutații la nivelul genelor A și B, implicate în producerea

unor proteine care intră în structura capului; aceste mutații de tip *amber* produc dependența fagilor Charon de gazdă, care le oferă un ARNt supresor, pentru asigurarea sintezei celor două proteine; astfel, propagarea fagilor respectivi se poate face numai în condiții de laborator, pe gazde *Su⁺* foarte rare în natură.

Construirea vectorilor de inserție este bazată pe faptul că gena *CI* a fagului lambdoid 434 are un singur situs pentru *Eco* RI și pentru *Hind* III. Eliminarea situsurilor pentru alte enzime de restricție, situate în alte regiuni genomice, a dus la realizarea unei serii de vectori fagici (Murray și Murray, 1975; 1977). Astfel, vectorul Charon 7 are modificările menționate mai sus și a fost utilizat pentru clonarea unor fragmente de până la 10 kpb, recombinanții fiind mult mai rezistenți decât vectorul parental (Blattner și colab., 1977).

Vectorul Charon 4A este un vector de substituție, utilizat pentru obținerea bibliotecilor de gene eucariote. El poate fi restricționat cu *Eco* RI în gena *lacZ* și în operonul *bio*, recombinanții fiind *lac⁻bio⁻*. Fragmentele insert pot avea între 6,9–7,8 kpb. Vectorul Charon 21A permite clonarea unor inserți mai mari (până la 9 kpb) și poate fi hidrolizat cu 4 enzime de restricție. Charon 32 acceptă inserți de 19 kpb, iar Charon 33 de 20 kpb.

În general, dezavantajele vectorilor Charon constau în numărul limitat de situsuri de restricție pe care le au.

4.2.3. VECTORI DERIVAȚI DE LA GENOMUL BACTERIOFAGILOR FILAMENTOȘI

În funcție de morfologia lor, fagii cu ADN monocatenar se împart în două categorii: fagi filamentoși (M13, fd, fl) și fagi sferici sau izometrice (G4, Φ X174, S13). Ei au constituit un model pentru elucidarea unor aspecte ale inițierii replicării elementelor extracromozomale pe care le poate conține celula bacteriană sau pentru transcrierea din ORF suprapuse. Genoamele fagilor filamentoși sau anumite segmente ale acestora, implicate în replicare/transcriere, au fost utilizate pentru obținerea de vectori.

4.2.3.1. Biologia moleculară a bacteriofagilor filamentoși. Virionii maturi ai colifagilor M13, fd, fl sunt filamente cu o lungime de circa 1 μ m, fiecare având un cromozom de aproximativ 6 400 nucleotide (cu zece gene și o regiune intergenică IG); genomul reprezentat de ADN monocatenar are polaritate pozitivă. ADN respectivi au fost caracterizați și utilizați în ultimii 20 de ani, iar secvențializarea a arătat că deosebirile existente între fagi sunt minore, funcțiile genice și mecanismul molecular de propagare fiind similare (fig. 24). Bacteriofagii filamentoși infectează celulele bacteriene prin intermediul pililor F. Ei nu se replică litic, ci coexistă sub formă lizogenă, timp de multe generații în celulele infectate, motiv pentru care pot fi utilizați ca vectori virali.

Necesitatea celei de a zecea gene virale pentru sinteza ADN fagic (tradusă din regiunea genei 2, care codifică pentru capătul C-terminal al proteinei corespunzătoare) a fost demonstrată prin analize mutaționale. Genele 2, 10, 5, 7, 9

și 8 se exprimă crescător în această ordine, ultima fiind flancată de un terminator pentru exprimarea genei 3. Genele 3, 6, 1 și 4 se exprimă ocazional, tot în sistem cascadă, terminatorul acestora fiind localizat între genele 4 și 2. Pentru fagul fd, cel mai lung segment IG conține circa 200 de nucleotide, care au patru regiuni cu structuri în „ac-de-păr”, implicate în replicarea și împachetarea genomului viral. Structura majoră în „ac-de-păr” conține situsul pentru proteina genei 2 (inițiatorul sintezei genomului viral).

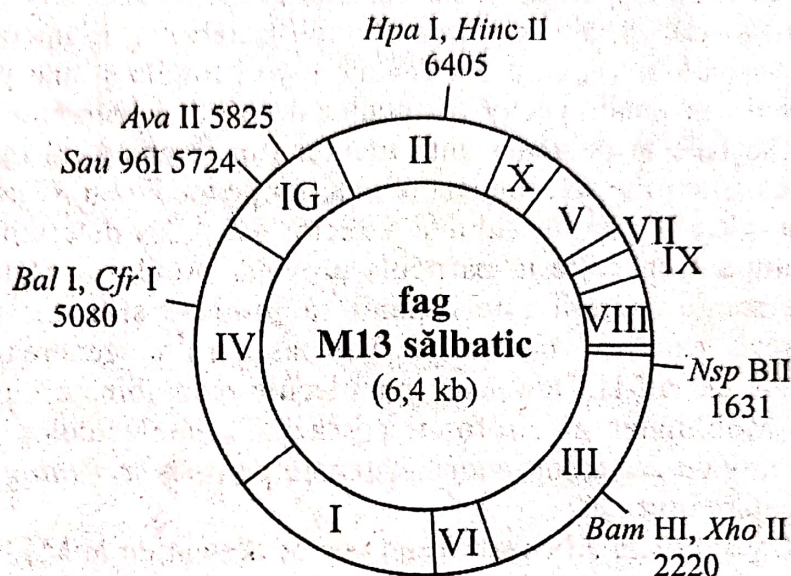


Fig. 24 – Harta genomului fagului filamentos M13.

Genomul fagic se replică prin intermediul inelului rotativ, ceea ce implică apariția unei conformații replicative intermediare, bicatenare (FRI) (fig. 25).

Sinteza catenei pozitive se face cu ajutorul proteinei genei 5, de legare la ADN monocatenar; aceasta „învelește” prelungirea inelului rotativ, trecere necuplată cu încapsidarea (ca la fagul Φ X174). Pe matrița catenei negative se sintetizează ARNm corespunzători.

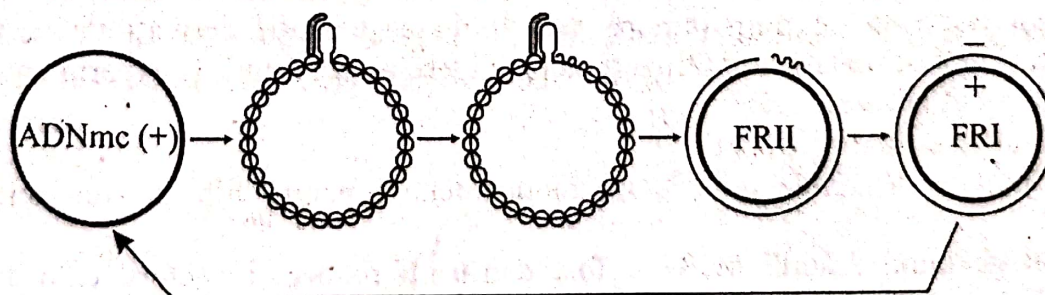


Fig. 25 – Schema replicării genomului fagilor filamentoși cu ADN monocatenar.

În pofida absenței lizei celulelor gazdă, fagii filamentoși formează plaje. Acest lucru se poate datora faptului că celulele infectate continuă să crească și să se dividă, însă cu o rată mai mică decât a celor neinfectate, producând o anumită turbiditate în masa bacteriană, asimilată cu aspectul clasic al plajelor.

Formele replicative dublu catenare pot fi izolate prin tehnicile standard de purificare a plasmidelor, iar virionii pot fi recuperați, cu obținerea ADN de înaltă puritate, pentru utilizarea ca matriță în reacțiile de secvențializare.

4.2.3.2. Strategii de utilizare a vectorilor din fagii filamentoși. Deși nu există o limită definită a dimensiunii moleculei de ADN M13 recombinat care poate fi împachetată în particula fagică, în practică s-a constatat că inserții cu dimensiuni mai mari de 5 kpb sunt subiectul unor rearanjamente frecvente în cursul propagării. Inserția ADN străin în genomul unui bacteriofag filamentos determină formarea unor particule mari, care pot deveni uneori fragile și mai puțin eficiente replicativ. Cel mai convenabil vector filamentos derivă de la genomul fagului M13, în care inserția se face în prezența unui marker (un fragment al operonului *lac*, denumit *lacZ'*), care permite selecția recombinanților pe mediu cu X-gal.

Orientarea relativă a pasagerului și a vectorului ADN determină care dintre catenele insertului se regăsește în particula progenă. Acidul nucleic din clonele cu inserți în orientare inversă este capabil să formeze structuri parțial dublu catenare, deoarece catenele omoloage ale pasagerului generează duplexuri (regiunile derivate de la M13 ale acestor molecule recombinante rămân în formă monocatenară). Mobilitatea electroforetică scăzută a moleculelor parțial dublu catenare comparativ cu cea a formelor bicatenare permite *screening*-ul coloniilor cu inserți în orientare inversă.

În 1982, Ray și colab. au construit un vector derivat de la M13, cu deleții în regiunea corespunzătoare originii catenei complementare. Datorită potențialului redus de creștere a patogenilor în afara laboratorului, acest tip de vector este sigur, negăsind o altă nișă ecologică.

Regiunea genomică a ADN M13 cel mai frecvent utilizată pentru clonare este reprezentată de un spațiu intercistronic de 508 baze (care conține originea de replicare), situat între genele 2 și 4. Pentru obținerea recombinanților, ADN FRI este izolat, tăiat prin restricție și folosit pentru ligare, la fel ca în cazul lucrului cu ADN plasmidial. Transformanții pot fi izolați ca plaje sau, în cazul vectorilor care conțin markeri de rezistență la droguri, sub forma coloniilor pe mediu selectiv.

Deși eficiența de transformare este limitată, vectorii derivați de la fagii filamentoși monocatenari sunt utilizați cu precădere în trei tipuri de experimente:

- secvențializarea ADN;
- mutageneza direcționată;
- obținere de sonde moleculare monocatenare pentru hibridizarea acizilor nucleici.

Din genomul fagului M13 au fost construiți numeroși vectori, cum ar fi: M13mp2 (cu situs pentru *Eco* RI), M13mp8/9 și M13mp18/19 (conținând 9, respectiv 13 situsuri unice de restricție), precum și o regiune a genei β -galactozidazei (care permite selecția recombinanților pe mediu cu X-gal) etc. (fig. 26).

În perechile de vectori derivați de la M13, clonarea insertului ADN se poate face în ambele orientări, ceea ce permite determinarea secvenței de la ambele capete, cu utilizarea unui singur *primer* la secvențializare.

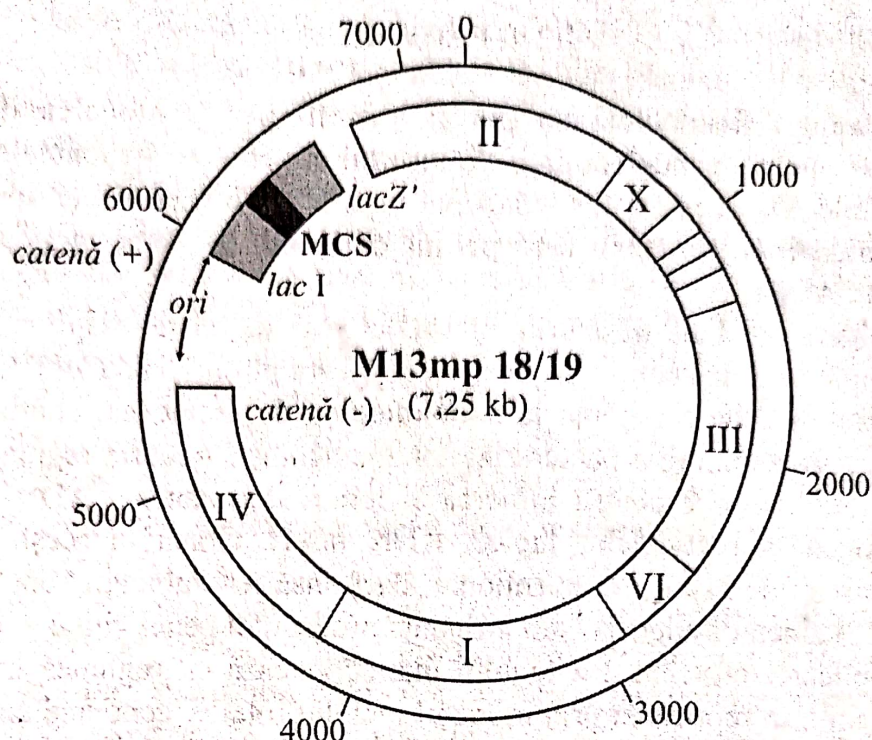


Fig. 26 – Harta vectorului M13mp18/19.

Tulpinile bacteriene gazdă pentru acești fagi trebuie să corespundă anumitor cerințe. De exemplu, tulpinile *E. coli* JM109 și JM103 conțin plasmida *Flac*, cu deleția *lacZ*ΔM15, și mutația *traD*, prin care celulele își pierd capacitatea lor de conjugare, deși au pili F (Messing și colab., 1981).

Pentru secvențializare, clonarea acidului nucleic în fagul M13 reclamă utilizarea unui *primer* derivat fie dintr-o regiune din interiorul segmentului de clonat, fie dintr-o regiune ADN M13 adiacentă situsului de clonare. Confirmarea secvențializării poate fi efectuată și prin analiza bazelor catenei complementare, dintr-o clonă cu orientare inversă.

În practică, s-a realizat designul unor plasmide multifuncționale *pTZ18R/19R*, care pot fi replicate ca ADN monocatenar. Vectorii de acest tip permit clonarea, secvențializarea, mutageneza *in vitro* și transcrierea *in vitro* într-unul și același sistem. Pentru generarea ADN bi- sau monocatenar, aceste vehicule de mici dimensiuni (2,9 kpb) au în construcția lor *ori* *pBR322* și *ori* *f1*, gena *lacZ'* (în care se află inserat MCS de la *pUC18/19*), precum și un promotor de la T7 în vecinătatea MCS. După transformarea gazdei JM103, plasmidele pot fi izolate ca ADN dublu catenar pentru clonare sau transcriere *in vitro* cu ajutorul polimerazei ARN T7. Când celulele transformate cu *pTZ* sunt suprainfectate cu fagul helper M13 K07, se produce *pTZ* monocatenar, secretat din celulă. După izolare, ADN *pTZ* poate fi utilizat pentru mutageneză țintită sau pentru secvențializare cu dideoxinucleotide, folosind primeri pentru revers-secvențializare.

4.2.4. FAGEMIDE

Bacteriofagii filamentoși nu pot fi utilizați pentru clonarea de rutină și propagarea segmentelor nucleotidice ale insertului, deoarece genoamele lor tind să devină instabile. De aceea, a fost conceput un alt tip de vectori, de tip plasmidial, numit fagemidă (*phagemides*), care permit obținerea de copii monocatenare ale unor secvențe ADN.

Fagemidele combină trăsăturile plasmidelor și ale bacteriofagilor filamentoși. Cele mai simple vehicule conțin originea de replicare plasmidială *Col E1*, ca markeri de selecție, au gene de rezistență la antibiotice și, de asemenea, conțin o copie a regiunii intergenice majore a bacteriofagilor filamentoși. Această regiune are în *cis* toate secvențele necesare pentru inițierea și terminarea sintezei ADN viral, ca și pentru morfogeneza particulelor fagice. ADN insert, clonat în acești vectori, se propagă în plasmide în mod convențional; dacă însă recombinatii sunt infectați cu bacteriofagul filamentos adecvat, sub influența produsului genei virale 2, își modifică modul de replicare: proteina 2 a fagului interacționează cu regiunea intergenică a fagemidei și inițiază replicarea prin modelul inelului rotativ, generând copii ale unei singure catene. După creștere și circularizare, ADN monocatenar poate fi împachetat în particule progene. Monocatenenele obținute pot servi ca matriță pentru secvențializare prin metoda dideoxinucleotidelor, pentru mutageneză țintită (folosind oligonucleotide sintetice) sau pentru sinteza sondelor moleculare monocatenare.

Unul dintre dezavantajele fagemidelor este acela că, în anumite cazuri, nivelul de ADN monocatenar obținut după infecția cu bacteriofagul *helper* este mai scăzut de 10^2 ori decât la clonarea în vectori derivați de la M13. Cauzele care pot determina acest fapt pot fi generate de:

- dimensiunea și natura insertului clonat în fagemidă;
- secvența regiunii intergenice conținută de fagemidă (plasmidele care conțin întreaga regiune IG interferă cu ADN din fagul *helper*; obstacolul a fost învins prin deletarea segmentelor responsabile de acest efect din regiunea intergenică sau prin utilizarea unor *helperi* mutanți, rezistenți la interferență);
- situsul la care este inserată în plasmidă regiunea intergenică;
- natura bacteriofagului. Atât fagii filamentoși sălbatici, cât și mutanții lor rezistenți la interferență pot fi utilizați ca *helper*; rezultatele experimentale au arătat că, în timp ce primii sunt eficienți în cazul fagemidelor mari (cu inserti de peste 10 kpb), ceilalți dau rezultate bune pentru fagemidele mici (inserti mai mici de 5 kpb).

Vieira și Messing (1986) au sintetizat fagemidele *pUC118* și *pUC119*, care sunt mult mai puțin sensibile la dimensiunea insertului ADN și păstrează avantajele clonării în plasmide *pUC*. Celulele transformate cu aceste fagemide și infectate cu un virus *helper* adecvat (M13K07) produc cantități suficiente de particule progene conținând copii monocatenare ale ADN plasmidial. Acest tip de vectori permite clonarea unor segmente insert mult mai mari decât cele permise de vectorii derivați de la M13. *pUC118/119* provin din *pUC18/19* și conțin un fragment de 476 pb

derivat din regiunea intergenică a bacteriofagului M13 (tulpina sălbatică), inserat la situsul de restricție pentru enzima *Nde* I. Regiunea IG a fagemidei este astfel orientată încât particulele virale progene să conțină aceeași catenă a regiunii *lac* ca și bacteriofagii seriei mp (fig. 27).

Infectarea celulelor purtătoare de fagemide cu virusul *helper* M13K07 duce la obținerea de particule fagice care conțin copii monocatenare ale genomului fagemidei. M13K07 este un derivat al bacteriofagului M13 și posedă o mutație în gena 2 (derivată de la M13mp1), originea de replicare plasmidială (de la *p15A*) și gena de rezistență la kanamicină (de la Tn903). Când virusul *helper* infectează celulele purtătoare de fagemide *pUC118/119*, ADN monocatenar este convertit în forma bicatenară, care utilizează pentru replicare originea plasmidială (*p15A*). Deoarece acumularea de ADN bicatenar *helper* nu reclamă produși genici virali, există o probabilitate scăzută ca fagemidele rezidente să interfere cu replicarea genomului bacteriofagului.

Genoamele dublu catenare rezultate exprimă toate proteinele necesare sintezei progenilor monocatenari; produsul genei 2, codificată de M13K07, interacționează însă mai puțin eficient cu originea de replicare fagică a propriului genom (optând mai degrabă pentru cea din *pUC118/119*), ceea ce duce la obținerea preferențială a catenelor (+) din fagemide.

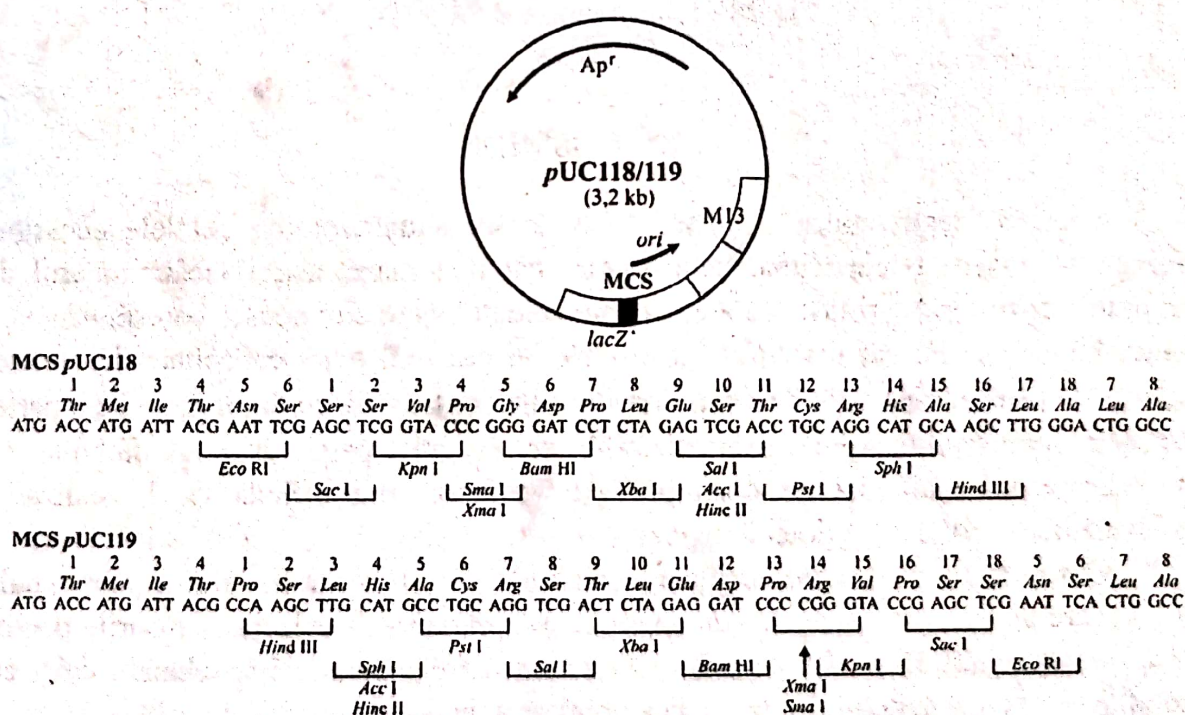


Fig. 27 – Harta fagemidelor din seria pUC.

Un alt exemplu de fagemid, care conține regiunea IG a fagului f1, este pBluescript SK, cu posibilitatea clonării în ambele sensuri (+)/(-), prezentat în fig. 28.

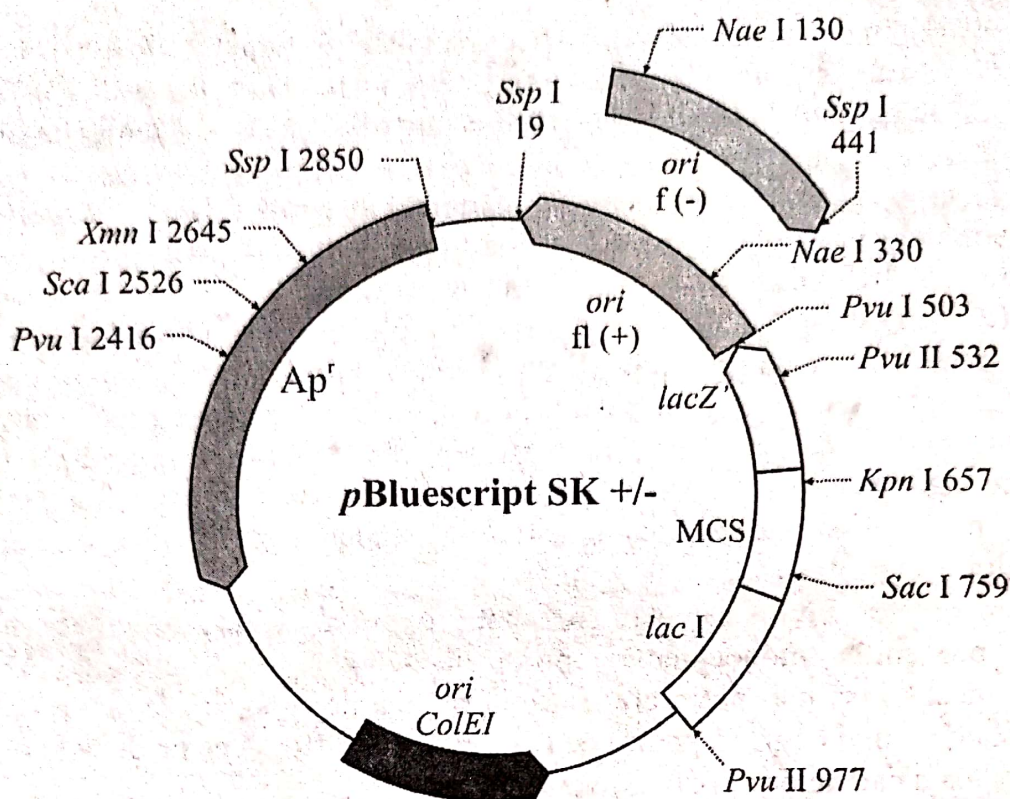


Fig. 28 – Harta pBluescript SK (+)/(-).

4.2.5. COSMIDE

Vectorii ideali pentru clonarea ADN înalt polimerizat din celulele eucariote trebuie să posede o capacitate de integrare cât mai mare, astfel încât numărul de recombinări necesari pentru izolarea segmentelor clonate suprapuse, corespunzătoare genelor mari, să fie cât mai mic. Cosmidele au cea mai mare capacitate de clonare cunoscută până acum, dar sunt relativ rar utilizate comparativ cu fagul λ , pe de o parte, datorită comportamentului „imprevizibil”, pe de altă parte, datorită faptului că obținerea unei biblioteci de cosmide este intrinsec mai dificilă decât realizarea echivalentului, adică a bibliotecii fagice.

Cosmidele sunt structuri artificiale construite din elemente de origine plasmidială (de la care au fost preluate originea de replicare, markerii de selecție, situsurile pentru restricție enzimatică) și elemente de natură fagică (regiunea de împachetare *cos*), cu condiția existenței genelor implicate în sinteza proteinelor de înveliș.

Pentru a mări eficiența transferului de gene mediat de vectorul fagic, este necesară împachetarea, care are loc numai dacă vectorul exprimă genele virale necesare asamblării capului bacteriofagului (E, alături de D, A, B, W, J, I, K). Mutanții defectivi în gena E nu produc particule fagice, dar pot fi utilizați prin cocultivare cu tulpina sălbatică, ce asigură funcțiile absente.

Cosmidele au fost utilizate pentru prima oară ca vectori de clonare de către Collins și Holm (1971), care au încercat să depășească problemele tehnice ridicate de clonarea unor secvențe mari de ADN în *E. coli*. Într-un vector plasmidial de clonare convențional, de circa 4–5 kpb, au fost introduse secvențe *cos* de la bacteriofagul λ , ceea ce a permis utilizarea protocoalelor de împachetare a fagului. Secvențele *cos* și aproximativ 200 pb ale ADN fagic de o parte și de alta a insertului constituie elementele necesare pentru împachetarea ADN recombinat în particule λ preformate. Succesul împachetării este condiționat de prezența celor două secvențe *cos* separate între ele de 38–52 kpb (fig. 29).

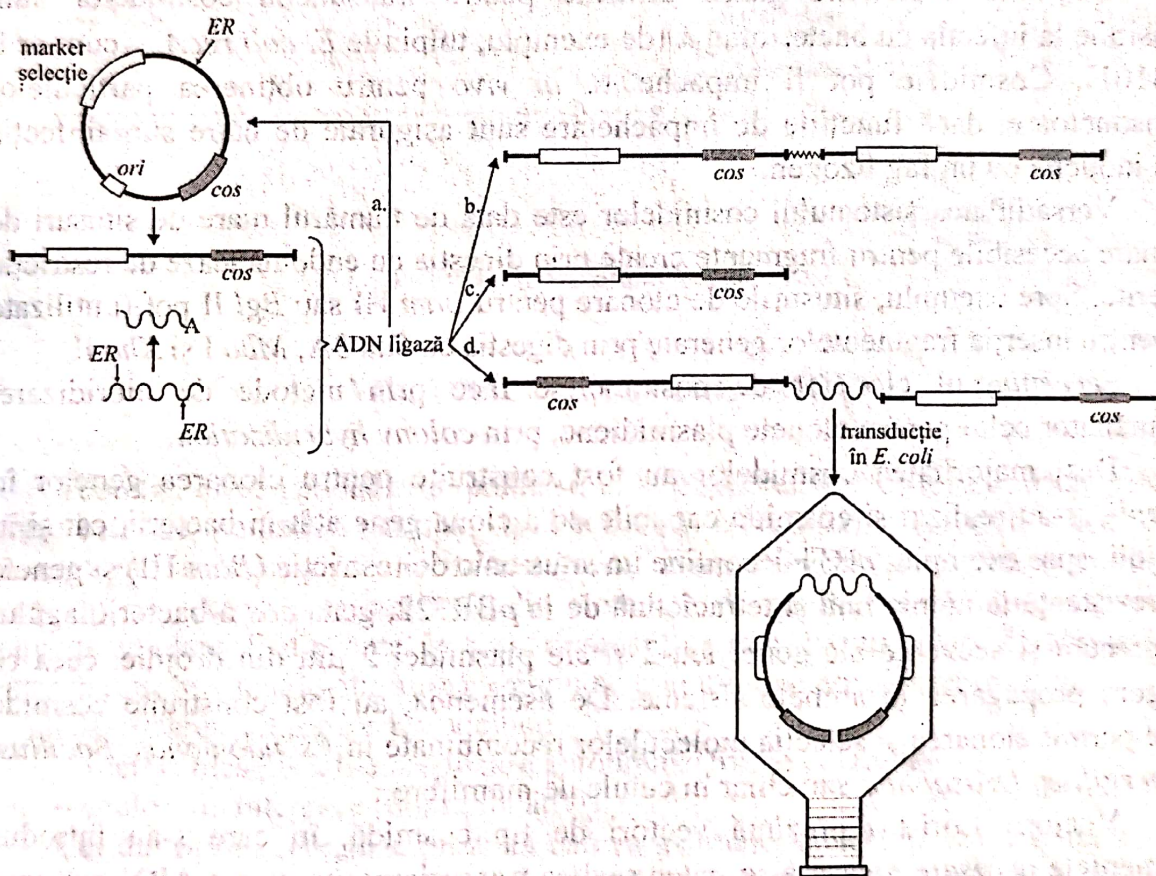


Fig. 29 – Schema de construcție a cosmidelor.

Moleculele de cosmide recombinante se realizează prin ligarea ADN insert (circa 30–45 kpb) la vectorul plasmidial restricționat, ceea ce duce la formarea unor concatemi lungi, de tip ADN cosmidă-ADN eucariot-ADN cosmidă. Acest lucru crează distribuția necesară a situsurilor *cos* pentru împachetarea *in vitro* și menținerea proprietăților biologice. Achiziționarea cosmidelor de către celulele bacteriene-gază poate fi condiționată de prezența unui marker de selecție. O dată intrate în citoplasmă, cosmidele se replică la fel ca plasmidele,

iar ADN poate fi izolat prin tehnicile standard aplicate bacteriilor. Împachetarea *in vitro*, ca și transducția, impune o selecție din punctul de vedere al mărimii cosmidei, deoarece numai moleculele ADN cuprinse în domeniul 35–50 kpb sunt recuperate eficient, deci se selectează doar recombinatii cu insert mare. Cosmidele utilizate în mod curent au dimensiuni de 6–24 kpb, iar insertul trebuie să compenseze diferența între dimensiunea cosmidei și fragmentul de genom λ necesar împachetării. În acest fel, selecția pe baza dimensiunii recombinatului reduce numărul de vectori supuși *screening*-ului în cazul realizării bibliotecilor de gene și elimină dezavantajele vectorilor plasmidiali, unde dimensiunea insertului este mai mică și limitantă.

Tulpinile bacteriene gazdă utilizate pentru transducția cosmidelor sunt sensibile la infecția cu bacteriofag λ (de exemplu, tulpinile *E. coli* *recA*⁻ – cum ar fi HB101). Cosmidele pot fi împachetate *in vivo* pentru obținerea particulelor transductoare, dacă funcțiile de împachetare sunt asigurate de către suprainfecția sau inducția cu un fag lizogen.

Versatilitatea sistemului cosmidelor este dată de numărul mare de situsuri de clonare accesibile pentru fragmente create prin digestia cu endonucleaze de restricție diferite. Spre exemplu, situsurile de clonare pentru *Bam* HI sau *Bgl* II pot fi utilizate și pentru inserția fragmentelor generate prin digestia cu *Sau* 3A, *Mbo* I și *Xho* II.

Screening-ul clonelor de cosmide se face prin metode de hibridizare, asemănător celui pentru clonele plasmidiene, prin *colony hybridization*.

Deși majoritatea cosmidelor au fost construite pentru clonarea genelor în *E. coli*, s-au realizat și cosmide capabile de a clona gene atât în bacterii, cât și în drojdii; spre exemplu, *pBTI-1* conține un situs unic de restricție (*Bam* HI) și genele de rezistență la ampicilină și tetraciclină de la *pBR322*, gena *cos* a bacteriofagului λ , precum și secvențe ale genei *leu-2* și ale plasmidei 2 μ m din drojdie, ceea ce asigură propagarea în ambele sisteme. De asemenea, au fost construite cosmide care permit clonarea și selecția moleculelor recombinate în *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Drosophila* sau chiar în celule de mamifere.

Vectorii Lorist reprezintă vectori de tip cosmidă, în care s-au introdus elementele necesare pentru a se putea realiza transcrierea *in vitro* a ARN mesager corespunzător pentru ADN al genelor clonate. Acești vectori conțin, alături de elementele tipice cosmidelor, și doi promotori puternici (de la fagii T7 și SP6), care flanchează o secvență cu situsuri de restricție. Prin transcriere *in vitro* cu ajutorul ARN polimerazei T7/SP6 se obțin mesagerii sens sau antisens. Vectorul Lorist este destinat sintezei sondelor moleculare de tip ARN necesare *screening*ului prin hibridizare în cadrul experimentelor cu „cromozomi plimbăreți”.

Relativ recent s-au construit sisteme care permit clonarea unor inserți de până la 100 kpb. Ele se bazează pe bacteriofagul P1 și sunt utilizate în mod asemănător vectorilor λ de înlocuire și cosmidelor (fig. 30).

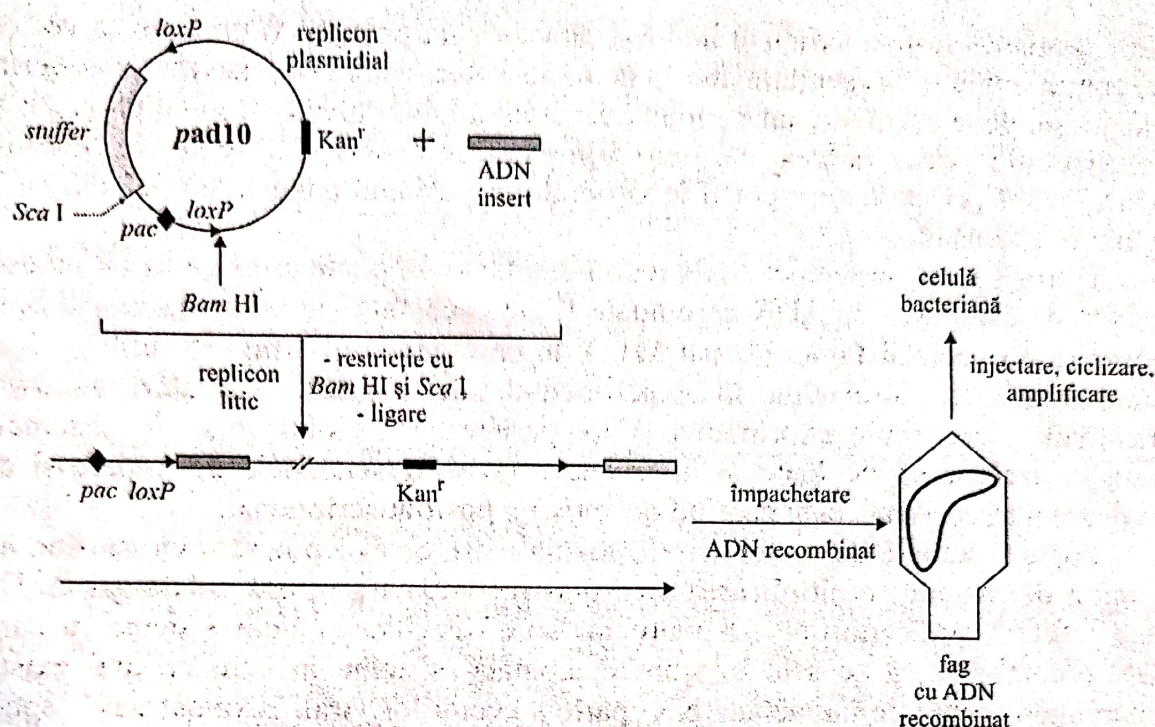


Fig. 30 – Structura vectorului de clonare P1.

4.3. VECTORI VIRALI EUCARIOȚI

Teoretic, orice genom viral poate servi la obținerea vectorilor eucarioți (EK). Pentru celulele mamaliene au fost destinați – din considerente practice – doar cei proveniți de la *Papovaviridae*, *Adenoviridae*, *Herpesviridae* și ADNc retroviral. Acest tip de vectori este construit din elemente de natură virală, dar conține și elemente celulare. Din păcate, în acest domeniu nu există reguli clare de obținere a construcțiilor, rezultatele obținute bazându-se mai mult pe considerente empirice.

Clasificarea vectorilor EK include:

- vectori plasmidiali cu replicare autonomă (forme epizomale) și
- vectori de integrare (nonreplicativi).

Cei din prima categorie prezintă câteva avantaje, constând în eficiența mare de transfecție stabilă, exprimarea uniformă a insertului pe care îl poartă și posibilitatea de recuperare relativ simplă și eficientă a vectorului.

Utilizarea virionilor infectanți, competent-replicativi ca vectori, permite amplificarea genei clonate în celula infectată și obținerea unor nivele ridicate de ARNm și, implicit, de produs de exprimare.

4.3.1. CRITERIILE PENTRU DESIGNUL UNUI VECTOR VIRAL MAMALIAN

Sunt analoge celor impuse de obținerea vectorilor derivați din bacteriofagul λ . Cea mai simplă metodă se bazează pe identificarea regiunilor genomice neesențiale pentru ciclul litic și înlocuirea lor cu gena de interes. Deoarece acele virusuri ale

căror genoame au fost suficient de bine caracterizate pentru a fi utilizate ca vectori nu conțin regiuni neesențiale mari, în majoritatea cazurilor insertul (pasagerul) înlocuiește gene esențiale, iar genomul recombinatului defectiv trebuie propagat în prezența unui virus *helper*, care să suplimenteze funcțiile absente. În anumite cazuri, genele virale *helper* pot fi încorporate în genomul gazdei, tehnică din ce în ce mai des folosită.

Dimensiunea moleculei ADN recombinat care se poate propaga ca virion este limitată de cantitatea de ADN care poate fi „împachetată” în particula virală. Spre deosebire de vectorii fagici (λ sau M13), în care genomul viral este utilizat doar pentru replicarea insertului, în experimentele de clonare în vectori eucarioti obiectivul îl constituie exprimarea ADN pasager. Mai mult chiar, în sistemele eucariote trebuie să fie luate în considerare nu doar semnalele de inițiere și de terminare a transcrierii, ci și profilul de *splicing* posttranscripțional.

Toate sistemele de vectori virali (mamalieni), cu excepția retrovirusurilor, au un mare dezavantaj: multiplicarea virusului recombinat omoară celula-gazdă. De aceea, atenția cercetătorilor s-a îndreptat spre dezvoltarea unor sisteme în care ADN recombinat să se afle în stare epizomală, sisteme în care nu mai există constrângeri legate de împachetare. O parte a vectorilor virali „exploatează” faptul că marea majoritate a sistemelor cunoscute se bazează pe virusuri tumorale, astfel încât însuși genomul viral are un mecanism de selecție bazat pe transformarea proprietăților de creștere a celulelor normale.

Genomul celor mai multe virusuri tumorale se integrează în ADN gazdă, fenomen însoțit de evenimente de rearanjare, care nu pot fi nici controlate, nici prevăzute. Atâta timp cât gena insert nu va inactiva gena virală transformantă (care este identificată), selecția fenotipului transformat va fi o certificare a integrării, inclusiv a prezenței pasagerului. Asemenea sisteme de vectori au o aplicabilitate restrânsă.

4.3.2. VECTORI DERIVAȚI DE LA ADENOVIRUSURI

Din familia *Adenoviridae* fac parte 40 de serotipuri diferite, implicate mai ales în infecții benigne ale tractului respirator. Deși multe tulpini adenovirale infectează celulele umane, tulpinile 2 și 5 ale subgrupului C sunt cele mai utilizate pentru obținerea de vectori, deoarece harta genomului lor este descifrată integral. Obținerea vectorilor adenovirali se bazează pe faptul că aceste virusuri produc titruri mari, au capacitatea de a se exprima la nivele ridicate, iar comportamentul lor este cunoscut din studiile pe termen lung privind utilizarea vaccinului corespunzător.

4.3.2.1. Biologia moleculară a adenovirusurilor. Adenovirusurile au ca genom un ADN dublu catenar care codifică pentru gena proteinei târzii (L1) și pentru genele reglatoare timpurii (E1-E4 – *early*), sunt fără înveliș, prezintă simetrie icosaedrică și pot infecta numeroase tipuri de celule. Replicarea virală are loc la nivelul nucleului celulelor-gazdă, fără integrare în genomul celular, deși uneori se poate produce și acest eveniment. Replicarea este mediată de proteine virale și celulare, fiind inițiată de un polipeptid viral legat covalent la capetele 3'

ale ambelor catene, fapt care elimină necesitatea unui *primer*. Genomul viral, de circa 36 kpb, codifică 11–15 polipeptide timpurii și târzii, disperse ca masă moleculară. După legarea la membrana celulei-țintă prin intermediul proteinei de capsidă, virusul este înglobat în endozom; pH-ul acid al acestuia determină disocierea particulei virale și eliberarea acidului nucleic viral, care – ajuns în nucleu – permite transcrierea proteinelor timpurii, inițierea replicării și transcrierea genelor târzii, corespunzătoare proteinelor de capsidă (fig. 31).

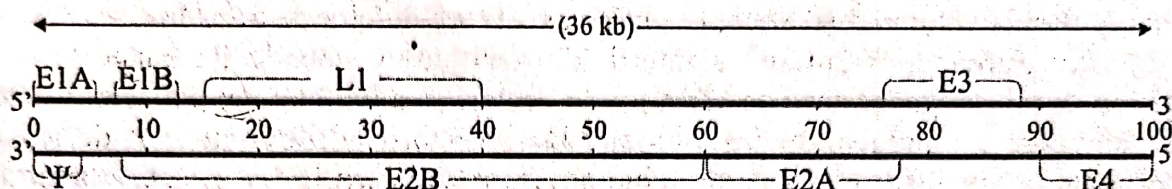


Fig. 31 – Harta genomului adenoviral (de 100 unități), cu localizarea genelor.

4.3.2.2. Strategii de obținere a vectorilor adenovirali. Metoda cea mai folosită pentru obținerea vectorilor adenovirali constă în substituirea genelor timpurii E1A și E1B cu insertul și, mai rar, a genei E3 sau a celei târzii. În vectorii dublu deletați, dimensiunea insertului poate ajunge până la 7,5 kpb. În mod deosebit, este preferată substituirea genei E1A, proteina codificată de ea având proprietăți litice sau oncogene. Înlocuirea genelor virale se poate face prin recombinare sau prin tehnici de biologie moleculară.

Primul vector adenoviral a fost obținut de Pericaudet și colab. (1985, 1990) și a constat în hidroliza ADN viral la situsul de restricție pentru *Cla* I (situat spre capătul 5' al genomului Ad5), având drept urmare îndepărtarea parțială a genelor E1A și E1B, cu păstrarea secvențelor terminale din această zonă (care codifică pentru încapsidare și originea de replicare). În paralel, s-a obținut un vector plasmidial de exprimare, cu un singur situs pentru *Cla* I; în aval față de acesta se află insertul, iar în amonte există o secvență terminală de genom adenoviral. Constructul a fost restricționat la *Cla* I și ligat la fragmentul adenoviral E1 negativ; recombinatul a servit apoi pentru transfecția liniei de celule 293 (linie de celule renale de maimuță), imortalizată anterior cu un vector care exprimă constitutiv proteinele E1A și E1B, furnizând funcțiile E1 în *trans* și permițând desfășurarea întregului ciclu replicativ. Selecția recombinanților s-a realizat prin hibridizare sau prin analiza produsului de exprimare.

Graham și colab. (1993) au construit un vector adenoviral printr-o metodă similară, inserția genei străine făcându-se în regiunea E3 a unui vector E1 deletat.

Vectorii adenovirali de mare capacitate (HC-Ad, *high capacity adenovectors*) se caracterizează și prin prezența, alături de insert, a unui fragment ADN „de umplură” (*stuffer*), necesar pentru echilibrarea dimensiunilor genomice în domeniul 27–36 kpb. Acest lucru este foarte important, deoarece influențează semnificativ nivelul și durata de exprimare a insertului (Schiedner și colab., 2002).

Vectori adenovirali se pot obține și prin recombinarea unor celule infectate cu adenovirus, cotransfectate cu plasmide care conțin secvențele insert, dar și secvențe ADN adenovirale omoloage. În acest fel, rezultă un procent mic de molecule de

ADN adenoviral, recombinarea omoloagă permițând obținerea a cel mult 10% recombinanți, care transfectează celule 293; ei se identifică prin *screening*-ul prezenței genei dorite. Vectorii sunt stabili la liofilizare. În general, acest tip de vectori este folosit pentru exprimarea unor proteine toxice (Edholm și colab., 2001).

Vectorii adenovirali pot infecta o gamă largă de celule. S-a observat o transducție eficientă atât în celulele replicative, cât și în cele nonreplicative. Deși s-a identificat ligandul pentru receptorul adenoviral, încă nu s-au realizat manipulări la acest nivel, în scopul țintirii exacte a celulelor de transdus.

Integrarea unor „piese” aleatorii ale genomului sălbatic de adenovirus în genomul celulei gazdă face ca acest tip de vectori să aibă un potențial semnificativ de inducere a mutagenezei inserționale. Deși vectorii adenovirali sunt deficienți cel puțin la nivelul unui set de proteine necesare replicării (E1A, E1B), în anumite tipuri de celule (HeLa) s-a observat complementarea funcțională, în care proteinele celulare endogene pot furniza funcțiile virale absente.

Recent au fost construiți vectori adenovirali care au regiunea repetitivă inversă (IR) inserată în gena E1, fapt care a condus la rearanjamente genomice, cu obținerea unor vectori lipsiți în totalitate de genele virale. Acești vectori, denumiți Δ Ad.IR, conțin numai caseta transgenei, flancată de ambele părți de duplicate IR bine determinate, semnale de împachetare virală și secvențe terminale IR.Ad. Deși exprimarea indusă de acest tip de vectori este tranzitorie, totuși se speră ca optimizarea lor să-i facă utili în terapia genică, deoarece ei infectează culturile de celule cu aceeași eficiență ca și vectorii adeno clasici (Steinwaerder și colab., 1999). De altfel, vectorii Ad.IR formează o nouă clasă de vectori care se replică selectiv în celulele tumorale; ei combină elemente care permit exprimarea transgenei tumor-specifice, replicarea virală eficientă și răspândirea în metastazele hepatice după administrarea sistemică a vectorului (Bernt și colab., 2002).

4.3.3. VECTORI DERIVAȚI DE LA VIRUSUL EPSTEIN-BARR (EBV)

Din categoria vectorilor plasmidiali replicativi fac parte și cei derivați din genomul virusului Epstein-Barr (EBV), care pot fi menținuți în forme stabile prin procese de deleție, recombinație, rearanjare și integrare. Vectorii derivați de la EBV, ca și ceilalți vectori EK de ultimă oră, utilizează și elemente din diverse alte surse: bacteriene (markeri de selecție, origine de replicare, promotori), gene celulare și virale, ca și elementele lor reglatoare (origini de replicare, promotori, situsuri de splicing, semnale de poliadenilare).

EBV este un virus herpetic, implicat în patogenia limfomului Burkitt, a carcinomului nazofaringian și a celui timic. Spectrul de gazdă al EBV include specia umană și câteva primate, adresându-se celulelor B (producând mononucleoză infecțioasă) și celor ale epiteliului nazofaringian, care exprimă receptorul c_3d (calea aparentă de intrare a virusului în celulă).

4.3.3.1. Biologia moleculară a EBV. În celulele transformate de către EBV se regăsește genomul viral complet, sub formă epizomală, în conformație de cerc

covalent închis. Virionii EBV au un ADN dublu catenar liniar de 172 kpb, care – după infectare – se circularizează la nivelul secvențelor terminale repetitive și se cantonează, în forma epizomală, în nucleul celular. În funcție de condiții, virusul este capabil de replicare de tip plasmidial sau litic, originile de replicare fiind distincte. Replicarea plasmidială este dependentă de originea *oriP* în *cis* și de acțiunea în *trans* a antigenului nuclear EBNA1; *oriP* conține două elemente:

- secvențe de câte 30 pb, bogate în AT, repetate în tandem de 20 de ori;
- o regiune de 125 pb, conținând 65 de elemente de simetrie, înrudite, în tandem.

Distanța normală dintre aceste regiuni este de aproximativ 900 pb; deleția oricărei secvențe suprimă replicarea epizomală, dar alterarea spațiului prin inserții/deleții nu afectează replicarea. Elementele de simetrie din *oriP* sunt situsurile de inițiere ale replicării, iar unitățile repetitive în tandem funcționează ca bariere ale furcii de replicare. EBNA1 (singurul factor viral necesar replicării de tip plasmidial) este o proteină de 65–80 kDa, codificată de un ORF din segmentul genomic viral Bam HI-K (fig. 32). Acesta se fixează de fiecare copie a unităților repetitive în tandem și de secvențele asemănătoare din interiorul elementelor de simetrie.

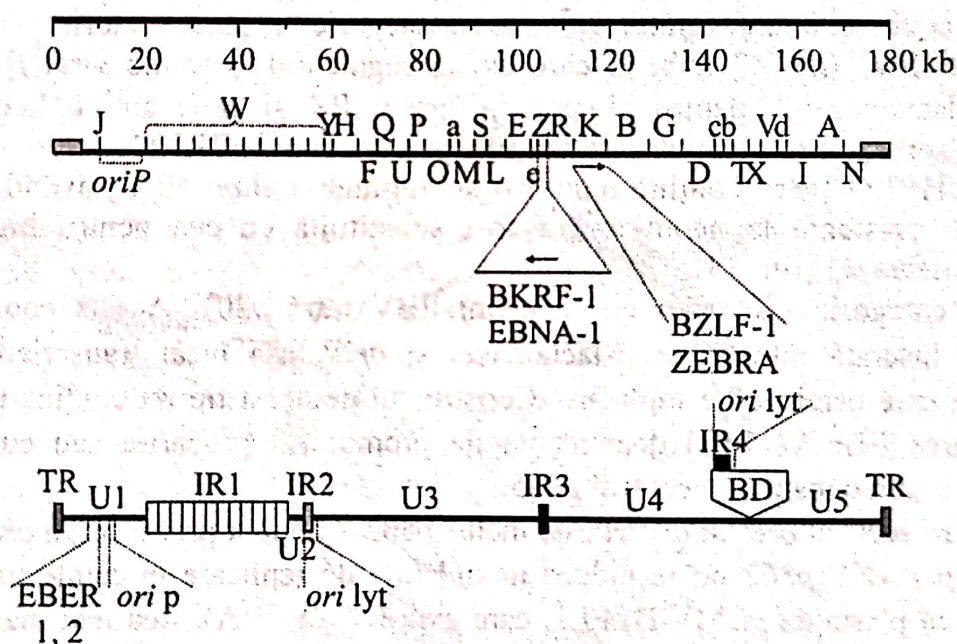


Fig. 32 – Harta genomului virusului Epstein-Barr, cartat pe baza restricției cu Bam HI.

EBV se poate replica și litic, ceea ce necesită elemente *cis* și *trans* distincte față de *oriP* și EBNA1. Elementul *cis* al originii de replicare litică (*ori lyt*), se situează în zona 52623 – 53581 a genomului EBV, fiind alcătuit din unități repetitive directe și inverse. O componentă *ori lyt* este aparent funcțională ca promotor/enhancer și poate fi înlocuită cu o zonă similară de la virusul citomegalic uman (HCMV). ZEBRA este factorul *trans*-activ necesar pentru inducția replicării litice și este produs de ORF BZLF1, situat în zona Bam HI-Z. În funcție de tulpina virală, ZEBRA constă dintr-o colecție de polipeptide eterogene, cu dimensiuni cuprinse în

domeniul 37–43 kDa, fiind un *trans*-activator pentru câteva gene virale. Este interesant de menționat că, în celulele infectate latent, transcriptul primar al EBNA1 se extinde peste cel al BZLF1 în antisens, proces care probabil servește la supresia transcrierii și/sau a traducerii proteinelor ZEBRA.

4.3.3.2. Strategii de obținere a vectorilor derivați de la genomul EBV.

Vectorii plasmidiali care conțin atât *oriP*, cât și EBNA1 se replică la fel ca plasmidele autonome în celulele permissive. EBNA1 poate fi suplinit în *trans* prin transformarea anterioară a celulei-gazdă cu EBV sau cu fragmentul de restricție adecvat, care să conțină ORF pentru EBNA1, legat de un promotor. Dacă celulele nu conțin EBNA1, funcția poate fi suplinită de către un alt vector. Plasmidele cu *oriP*/EBNA1, dar care au deleții mari sau mutații în regiunea codificatoare pentru EBNA1, nu se pot replica.

Fiind mare, genomul EBV este greu de manipulat ca plasmidă recombinată, cu potențial de transformare a *E. coli* și a celulelor eucariote, vectorii derivați păstrând doar elementele necesare menținerii virusului ca plasmidă. Vectorii *oriP* servesc la transfecția celulelor limfoblastice B și se replică analog plasmidelor stabile în celule EBNA1 pozitive, fără integrare. Din această categorie fac parte vectorii:

- *pBamC* (de 9,3 kpb, în care există segmentul genomic viral *Bam* HI-C, gena β -lactamazei – pentru selecția în sistem PK și gena aminoglicozidfosfotransferazei – pentru selecția în celule EK, precum și *ori pBR322*);

- *pHEBO* (care conține numai o subregiune a *Bam* HI-C, având 2,2 kpb; gena de rezistență la neomicină a fost substituită cu cea pentru higromicin-fosfotransferază) (fig. 33).

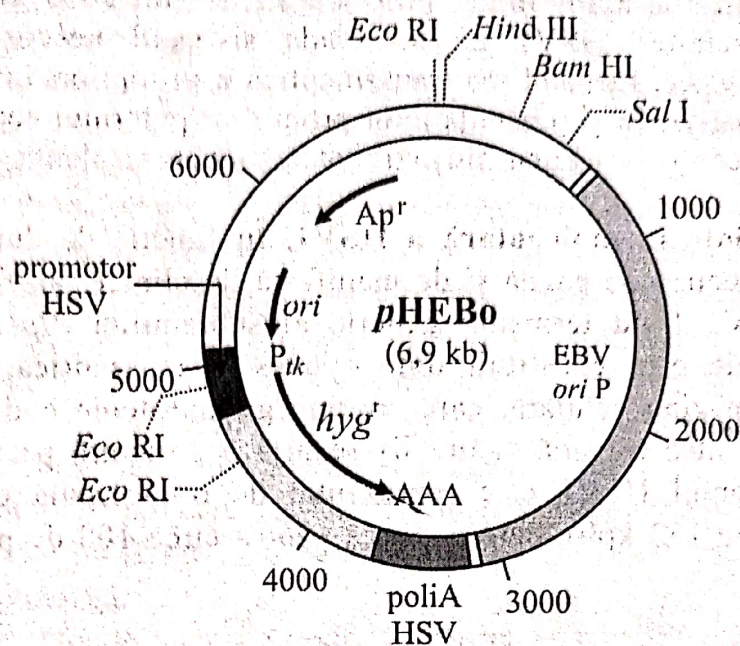
În categoria vectorilor cu repliconi EBV intră *p201*. Acesta conține gena EBNA1 inserată între gena β -lactamazei și *oriP*, așa încât transcrierea să fie orientată spre originea de replicare. Constructul de acest tip nu conține promotor, transcrierea EBNA1 fiind dependentă de promotorul procariot sau eucariot. O variantă a sa o constituie vectorul *p205*.

Între vectorii *oriP* și *ori lyt* este inclus *p562* – obținut prin inserția *ori lyt* (5,87 kpb) în *pHEBO* (*p562* poate induce modul litic de replicare în celule transfectate anterior cu plasmida *pCMV-BZFL1*, care exprimă ZEBRA). Cea mai mare parte a plasmidelor *p562* se prezintă sub forma unor concatemi cu masă moleculară mare, formă caracteristică replicării litice, prin intermediul modelului inelului rotativ.

Spectrul de gazdă al vectorilor derivați din genomul EBV include celulele B, cele ale epiteliului nazofaringian uman, fibroblastele umane, liniile limfatice T, fibrosarcoamele canine și celulele de rinichi simian.

Cele mai importante aplicații ale vectorilor derivați de la EBV sunt legate de exprimarea în EK, de mutagenază, toate bazate pe capacitatea vectorilor de a se menține în forma stabilă ca plasmide, fără deleții, integrări sau aranjamente. Pe de altă parte, stabilitatea acestor vehicule și replicarea sincronă cu genomul gazdă a permis construirea de vectori-suveică, ce conțin *oriP*, gena *tk* a HSV1 sau repliconul EBV și gena *lacZ* din *E. coli*.

a.



b.

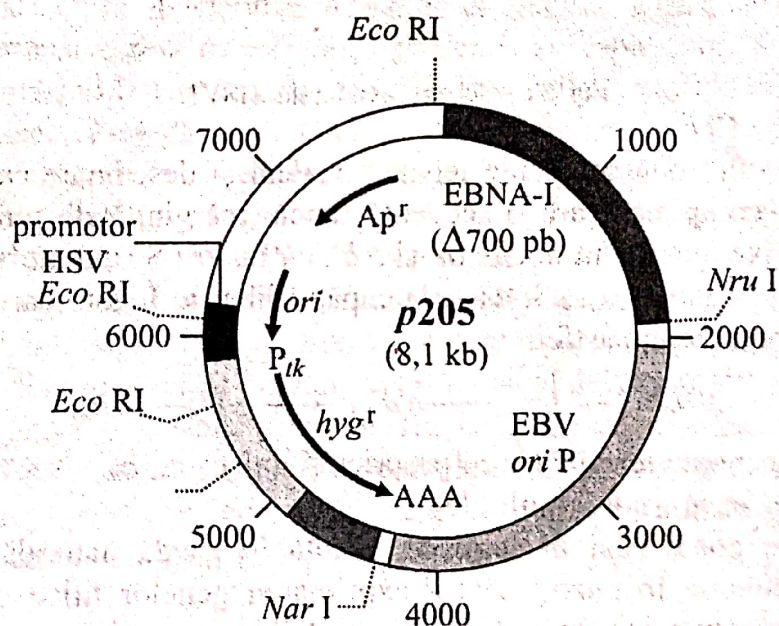


Fig. 33 – Harta unor vectori derivați de la genomul EBV.

4.3.4. VECTORI DERIVAȚI DE LA VIRUSUL HERPES SIMPLEX 1 (HSV1)

Acesta face parte din familia *Herpesviridae*, care grupează virusuri ce infectează vertebratele, toate având caracteristici comune. Interesul în utilizarea vectorilor derivați de la HSV1 în transferul de gene constă în posibilitatea de a

inv. 157085

exploata una sau mai multe dintre proprietățile acestui virus. Între ele, trebuie subliniată capacitatea HSV1 de a invada sistemul nervos după infecția țesuturilor periferice, răspândirea transsinaptică a virionilor, instalarea latenței în neuronii senzitivi, ca și prezența unor promotori puternici neurospecifici și a unor gene care controlează neuroinvasivitatea și neurovirulența.

4.3.4.1. Biologia moleculară a HSV1. În funcție de durata ciclului de replicare, de spectrul de gazdă și de manifestările clinice, au fost definite trei subfamilii, HSV1 fiind termenul generic al subfamiliei *Alphaherpesvirinae*. Virionul herpetic este constituit dintr-o capsidă icosaedrică, învelită într-o membrană de origine celulară, care conține glicoproteine codificate de către genomul viral. Între capsidă și înveliș se află o structură proteică, denumită tegument. Genomul HSV1 este reprezentat de o moleculă de ADN dublu catenar liniar (de 153 kpb), care codifică pentru circa 100 de proteine diferite (fig. 34).

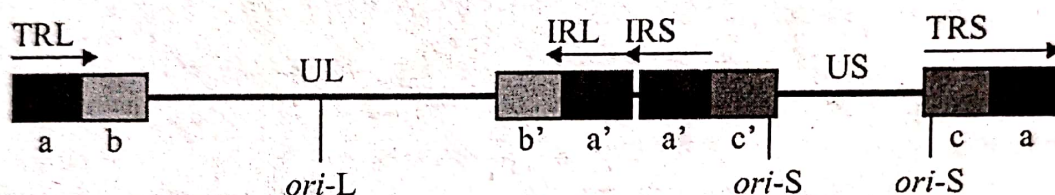


Fig. 34 – Schema genomului HSV1.

El constă din două segmente legate covalent și desemnate ca L (*long*) și S (*short*); fiecare component are o secvență unică, mărginită de unități repetitive. Unitățile repetitive ale L sunt notate ab și $a'b'$, iar pentru S sunt $a'c'$ și ca . Numărul de secvențe a la joncțiunea L-S, ca și la capătul liber al L este variabil. Genomul HSV1 poate fi reprezentat astfel:

$$a_L a_n b \text{-----} U_L \text{-----} b' a'_m c' \text{-----} U_S \text{-----} c a_S,$$

unde: a_L , a_S – secvențe terminale, cu proprietăți unice; a_n , a_m – secvențe terminale repetitive ($n = 0 \dots n$; m – copii multiple).

Virusul se poate găsi în stare de latență în gazda naturală, latența fiind definită ca o infecție în cursul căreia exprimarea genelor litice este reprimată, genomul fiind transcris doar parțial, fără liza celulei.

În structura ADN se deosebesc două tipuri de elemente genetice bine definite care acționează în *cis*: originea de replicare și secvențele „a” (repetitive), conținând semnalele de clivaj și de încapsidare a genomului. Dubla natură, litică sau latentă, a infecției herpetice reflectă coexistența în genomul viral a două programe alternative de exprimare genică. Programul litic se manifestă atunci când virusul infectează celule permissive (epiteliale sau fibroblaste; dependent de statusul lor funcțional, precum și de semnalele primite, celulele nervoase pot fi și ele permissive pentru infecția litică). Acest program corespunde exprimării secvențiale și ordonate a

ansamblului de gene virale, care conduce la moartea celulei infectate și la producția unei noi generații de virioni.

Genele litice sunt clasificate în trei clase cinetice α , β , γ , în funcție de momentul în care sunt exprimate în cursul ciclului de replicare virală. Fiecare dintre aceste clase conține gene esențiale (indispensabile pentru realizarea ciclului litic viral, iar deleția lor provoacă stoparea infecției) și gene neesențiale (care pot juca un rol important *in vivo*). Genele imediat timpurii (IE sau α , *immediate early*) codifică proteinele de reglare, care – la rândul lor – controlează exprimarea genelor virale timpurii (β) și târzii (γ). Genele β codifică atât proteine implicate în metabolismul nucleotidelor (timidinkinaza etc.), cât și proteine implicate în replicarea ADN viral (polimerază etc.). Genele γ codifică proteinele structurale, precum și unele proteine târzii, cu funcții de reglaj.

Mecanismul de replicare virală, cu orientare bidirecțională, pare a avea loc după modelul inelului rotativ, dar la sinteza ADN viral participă și evenimente de recombinare omoloagă.

Starea de infecție latentă presupune reprimarea totală a exprimării genelor virale litice și menținerea stabilă a genomului viral într-o formă care poate fi reactivată, genomul aflându-se ca element extracromozomal, asociat nucleozomilor. Această structură nu permite transcrierea genelor virale, exceptând unitatea LAT (*latency associated transcripts*), prezentă în două copii pe genomul viral. LAT se exprimă sub forma unei familii de ARN, caracterizat de lipsa extremităților 3'-poliA și 5'-cap. S-ar părea că LAT ar putea acționa ca ARN antisens, blocând exprimarea genelor litice. Regiunea LAT și în mod deosebit promotorul LAP1 (*latency associated promotor*) sunt elemente importante pentru construirea vectorilor virali derivați. LAP1 conține cutia TATA și motivul de fixare a proteinelor, clasic pentru genele eucariote. În aval de LAP1 se află LAP2, activ mai ales în cursul infecției litice. Regiunea necesară pentru exprimarea constitutivă a LAP1 constă din secvența de 1,5 kpb situată în aval de situsul de inițiere (incluzând și LAP2), regiune cunoscută sub numele LTE (*long term expression element*). Secvențele LTE reprezintă o regiune complexă, implicată în menținerea stării de latență și sunt importante inclusiv în domeniul transferului de gene, pentru care exprimarea insertului constituie interesul major.

4.3.4.2. Strategii de obținere a vectorilor derivați din genomul HSV1.

Datorită transferului de concepte și perfecționării tehnicilor de biologie moleculară utilizate în cazul altor sisteme de vectori și de modele de terapie genică, precum și pe seama contribuției tehnologiilor proprii HSV1 (construirea de cosmide și de cromozomi artificiali purtători ai întregului set de gene virale), a devenit posibilă manipularea genomului acestui virus în scopul obținerii de vectori. Inconveniente majore care au limitat utilizarea vectorilor derivați de la HSV1 sunt legate de citotoxicitatea virusului și de riscul de diseminare a acestuia în organism. În cazul folosirii vectorilor derivați de la HSV1 pentru terapie

genică umană, s-a urmărit reducerea citotoxicității, mai ales că o mare parte a populației este infectată cu HSV, existând posibilitatea apariției unui răspuns imun dirijat împotriva vectorului: acesta poate să întâlnească în organism un virus rezident latent, care ar determina reactivarea lui, cu posibilitatea recombinării între genomul sălbatic și cel inginerizat. Pe baza acestor observații se pot construi noi generații de vectori defectivi, nepatogeni pentru organismul receptor și stabili pe termen lung în exprimarea genică, precum și de vectori atenuați, care permit evoluția unei infecții litice într-o anumită populație celulară (de exemplu, în celule tumorale).

Se cunosc două tipuri de vectori derivați de la HSV1: vectorii recombinati și cei defectivi, de tip amplicon.

Vectorii recombinati pot fi sălbatici, atenuați sau defectivi. Pentru inserție se pot folosi diverși loci, în funcție de secvența ADN care a fost modificată prin introducerea genei heteroloage.

Vectorii sălbatici poartă insertul într-o regiune intergenică sau în situsuri a căror deleție nu se traduce prin scăderea capacității infectante. Vectorii de acest tip nu sunt utilizați în terapia genică, ci numai în cercetări fundamentale.

Vectorilor atenuați, cu deleții în gene neesențiale, le este afectată semnificativ replicarea în culturi de celule. Eliminarea anumitor gene poate reduce considerabil patogenitatea virusului, permițând diseminarea limitată în organism. Spre exemplu, mutațiile la nivelul genelor care codifică glicoproteinele gE sau gI reduc propagarea în sistemul nervos. Vectorii cu mutații în genele codificatoare pentru enzimele implicate în sinteza acizilor nucleici (TK, ribonucleotidreductază, uracil-DNA-glicozilază) sau proteinkinaza US3 nu se pot replica în neuroni și au tendința de latență, rămânând însă capabili de multiplicare și liză celulară, prin proliferare sub influența unui stimul. Dacă sunt introduși ținut în masa tumorală, acești vectori defectivi pot provoca eliminarea specifică a celulelor maligne, dar nu vor disemina în afara tumorii.

Vectorii defectivi, cu mutații în gene care codifică sinteza unor proteine esențiale pentru ciclul litic, reclamă o etapă prealabilă de amplificare în celule permissive, care completează funcțiile virale lipsă. Vectorii defectivi de primă generație au mutații în gena IE3 și cultivă pe celule E5 (VERO) sau M644 (BHK21), care suplinesc absența genei; ei pot exprima insertul *in vivo* sau *in vitro*, dar celulele infectate mor prin citotoxicitatea indusă de exprimarea altor gene IE. Sunt în curs de testare vectorii de a doua generație, delețați simultan în mai multe gene virale. Din această categorie fac parte vectorii:

- THZ.2, în care sunt deletate genele codificatoare pentru ICP (*infected cell proteins*) ICP4, ICP27, ICP22;
- 1820K, care poartă mutații în genele codificatoare pentru proteinele VP16, ICP0 și ICP4;
- d109, în care este deletat ansamblul de gene care codifică pentru proteinele IE.

Celulele infectate de către oricare dintre acești vectori pot supraviețui mai multe săptămâni, dar exprimarea stabilă a insertului pare a avea nevoie și de prezența proteinei ICP0, absența căreia se traduce prin prelatență.

Vectorii ampliconi sunt plasmide încapsidate; ei derivă de la plasmide care conțin, în afara originii de replicare *ori*, semnalul „a” de clivare și încapsidare al virusului herpetic. În prezența unui genom viral auxiliar (*helper*), purtător al funcțiilor de replicare și încapsidare a ADN, aceste plasmide sunt amplificate sub forma unui concatemer lung, alcătuit din unități repetitive (cap-la-coadă) ale plasmidei originale. Când atinge dimensiunea genomului herpetic (153 kpb), concatemerul este inclus în capsid virale preformate, generând particule amplicon, identice din punct de vedere al aspectului și al proprietăților imunologice cu particulele virale. Vectorii amplicon vehiculează multe copii ale insertului și, deoarece nu conțin nici o genă virală, sunt defectivi replicativ, netoxici și nepatogeni pentru organismul inoculat.

Primii vectori amplicon obținuți cu ajutorul unui virus auxiliar au fost contaminați de prezența acestuia și de aceea au fost mai puțin folosiți, chiar dacă *helperul* era el însuși defectiv. Strategiile recente de producere a acestor vectori folosesc fie prezența a cinci cosmide, fie pe cea a cromozomilor bacterieni artificiali (BAC); aceste elemente poartă ansamblul de gene virale care codifică funcțiile în *trans*, dar au deletate semnalele de încapsidare (evitându-se astfel împachetarea genomului auxiliar). O altă cale utilizează sistemul de recombinare specifică la situsul *Cre-loxP* al fagului P1. În acest sistem, genomul herpetic *helper* are secvențele de încapsidare „a” flancate de două situsuri *loxP* în orientare paralelă. Dacă producția de amplicon se face în celule care exprimă recombinaza *Cre*, secvențele „a” sunt deletate *in situ*, iar genomul auxiliar nu se mai poate încapsida, rezultând astfel vector pur (fig. 35).

În funcție de interesul urmărit (o exprimare la nivel ridicat și stabil sau o exprimare tranzitorie), se pot adopta diverse strategii. În general, prin utilizarea promotorilor de origine virală (omologi sau heterologi, cu excepția promotorului LAP), nu se obține un nivel ridicat al transcrierii genei de interes. În contextul folosirii terapeutice a acestor vectori, promotorii cei mai interesanți sunt derivați din LAP HSV1 sau conțin cel puțin regiunea LTE a acestuia. Sinteza proteinelor codificate de către insert pornind de la promotorul LAP este parțial limitată de faptul că în LTE sunt localizați numeroși codoni de inițiere a traducerii.

S-au dezvoltat câteva strategii care să asigure o mai eficientă exprimare a insertului în vectori derivați de la HSV1:

- înlocuirea regiunii LTE cu LTR derivat de la virusul leucemiei murine Moloney (MoMLV);

- inserția regiunii LTE într-un intron, prin introducerea unui situs donor și a unui situs acceptor al prelucrării posttranscripționale; în acest fel, LTE prezent la nivelul ADN este eliminat în transcriptul primar și are loc sinteza proteinei codificate de insert;

- introducerea unei secvențe de tip IRES (*internal ribosomal entry site*) între regiunea LTE și cea codificatoare a insertului; constructul permite traducerea corectă a proteinei de interes, grație recunoașterii directe a situsului IRES de către ribozomi.

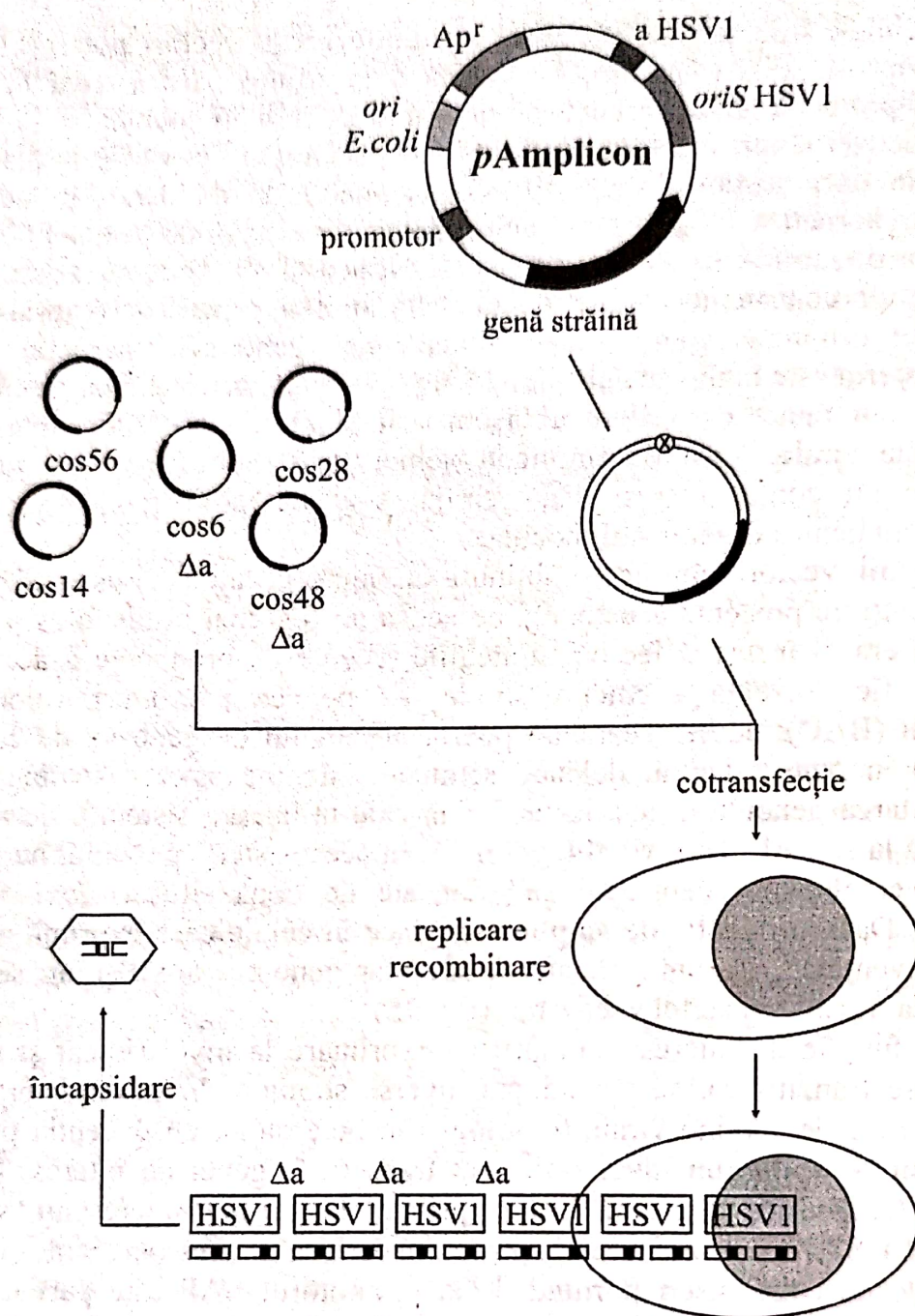


Fig. 35 – Schema de obținere a unui vector HSV1 amplicon.

4.3.5. VECTORI DERIVAȚI DE LA VIRUSUL SIMIAN VACUOLIZANT 40 (SV40)

Acest virus a captat în cel mai înalt grad atenția ca posibil vector de propagare a informației genetice exogene. SV40 este un virus cu un genom mic, secvențializat în totalitate. Face parte din familia *Papovaviridae*. Numele său provine de la efectul vacuolizant asupra celulelor substrat în care se propagă, iar

virionii au fost evidențiați în 1959, în vaccinurile antipolio preparate în culturi de celule renale de maimuță.

4.3.5.1. Biologia moleculară a SV40. Genomul viral este o moleculă de ADN dublu catenar, de 5243 pb, cu o conformație de cerc covalent închis. Situsul unic de restricție pentru *Eco* RI (numerotat prin convenție ca fiind 1) a stat la baza divizării hărții în regiuni, în sensul acelor de ceasornic, originea replicării virale pe această hartă fiind situată la 0,67. În funcție de specia de origine a celulelor pe care le infectează, SV40 poate urma două căi diferite de multiplicare:

- genomul se replică independent de cromozomii celulari, formând progeni (replicare litică);
- ADN viral se integrează stabil la nivel de cromozomi, replicându-se concomitent cu aceștia (replicare de tip lizogen).

Analizele genetice și biochimice au identificat un segment de 85 pb, incluzând *ori*, ca singurele secvențe în *cis* necesare replicării ADN SV40 (fig. 36).

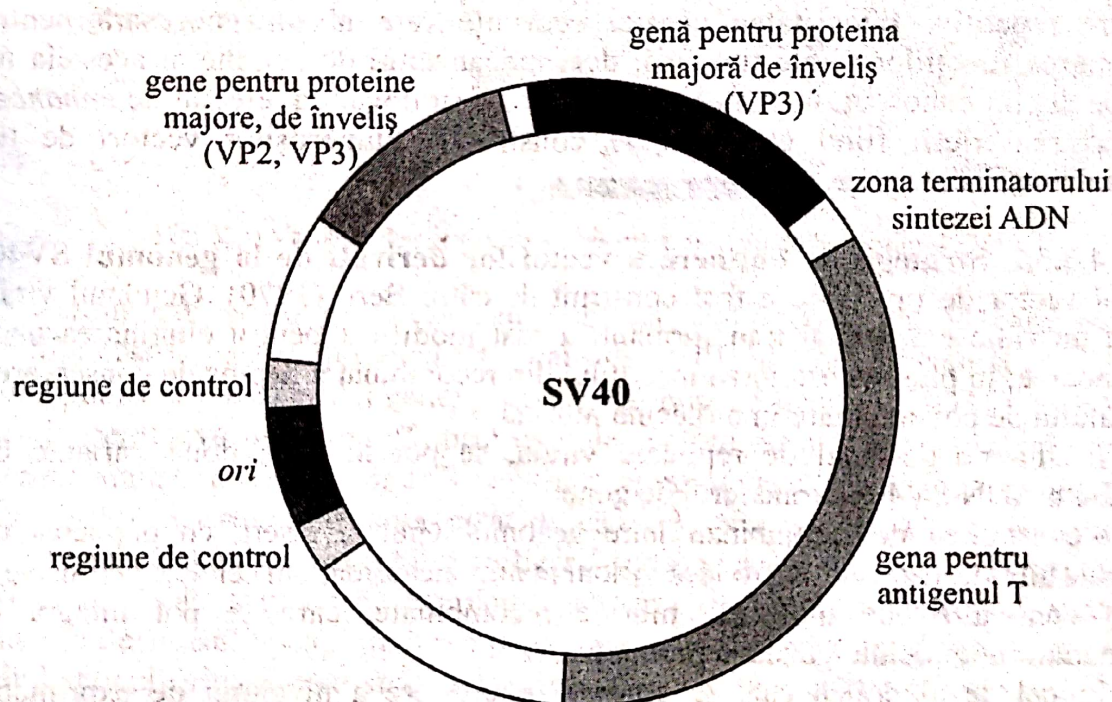


Fig. 36 – Harta genomului SV40.

Din punct de vedere funcțional, genomul SV40 este divizat în două regiuni (timpurie și târzie), transcrise de pe ambele catene ADN în direcții opuse. În celulele permissive, regiunea timpurie (E) este transcrisă pe calea ciclului litic, splicingul diferențiat generând două tipuri de ARNm, transcriși în sens antiorar, care codifică antigenele T și t (2,3 kpb și respectiv 2,6 kpb). Dintre aceste două proteine structurale, numai antigenul T se leagă specific la originea de replicare, inițiind acest proces. Deoarece *ori* și promotorul transcrierii timpurii sunt comune, antigenul T își autoreglează propria sinteză. Regiunea târzie este transcrisă numai

după activarea replicării și codifică proteinele de capsidă VP1, VP2, VP3. Acești transcripti târzii 3'-poliadenilați (care nu au cutia TATA) prezintă o mare dispersie a maselor moleculare, datorită profilului diferit de *splicing*. În celulele permissive, ADN SV40 se asociază cu histonele H2A, H2B, H3, H4, formând structuri nucleozomale octamerice, asemănătoare cu cromatina, cu aspect perlat. Există însă diferențe distincte între „cromatina” virală și cea celulară.

Ciclul de replicare lizogenă este caracteristic celulelor nepermissive (cum ar fi cele de rozătoare); în acestea, genomul viral se găsește numai în formă integrată. Celulele respective sunt transformate și devin imortalizate. La nivelul lor are loc doar transcrierea mesagerilor timpurii (pentru antigenele t și T). Integrarea genomului SV40 nu se petrece prin omologie de structură, ci prin intermediul antigenului T; evenimentul este însoțit de rearanjări la nivelul ADN viral, persistente timp îndelungat.

Regiunea control care se află de o parte și de cealaltă a *ori* SV40 are o proprietate remarcabilă: promotorul viral timpuriu conține nu numai cutia TATA și situsurile pentru 5'-capping, ci și o secvență de 72 pb, compusă dintr-un tandem repetitiv. Integritatea acestei secvențe este absolut necesară pentru exprimarea funcțiilor virale timpurii; deși mecanismul de acțiune al acesteia nu este pe deplin cunoscut, utilitatea sa practică a fost dovedită, efectul de *enhancer* asupra transcrierii fiind exploatat în construcția numeroșilor vectori de tip plasmidial sau cosmide.

4.3.5.2. Strategii de obținere a vectorilor derivați de la genomul SV40.

Primul vector de tip SV40 a fost construit de către Berg (1970). Genomul viral, având un ridicat potențial transformant, a fost modificat pentru eliminarea unor gene nocive; în plus, transcrierea insertului din recombinat a depins de conservarea semnalului de poliadenilare în molecula hibridă.

În funcție de tipul de replicare virală, se pot imagina două variante de utilizare a ADN SV40 în transferul de gene:

- construirea de recombinanți între genomul viral și insert, cu obținerea de molecule hibride, capabile să producă virioni maturi încapsidați, în celulele permissive;
- construirea de molecule hibride recombinante, care se pot integra în cromozomii unor celule-gazdă nepermissive.

În cel de al doilea caz, se constată o creștere a nivelului de exprimare, deoarece în celulele permissive promotorii târzii au o eficiență mult mai ridicată. Alt tip de cercetări s-a axat pe construirea unui virus helper. Dacă celula este coinfectată cu un recombinat în care insertul înlocuiește regiunea târzie și un mutant viral *tsA*, defectiv pentru funcțiile timpurii la 41°C, se constată că – la temperaturi nepermissive – replicarea apare prin complementare: recombinatul furnizează funcțiile timpurii, iar *helper*-ul pe cele târzii. Celulele transfectate cu o singură componentă a sistemului determină o infecție abortivă.

Cercetări relativ recente privind construcția de vectori defectivi ai SV40 au arătat că gena străină poate fi inserată fie în unitățile transcrise timpurii, fie în cele cu transcriere târzie (fig. 37).

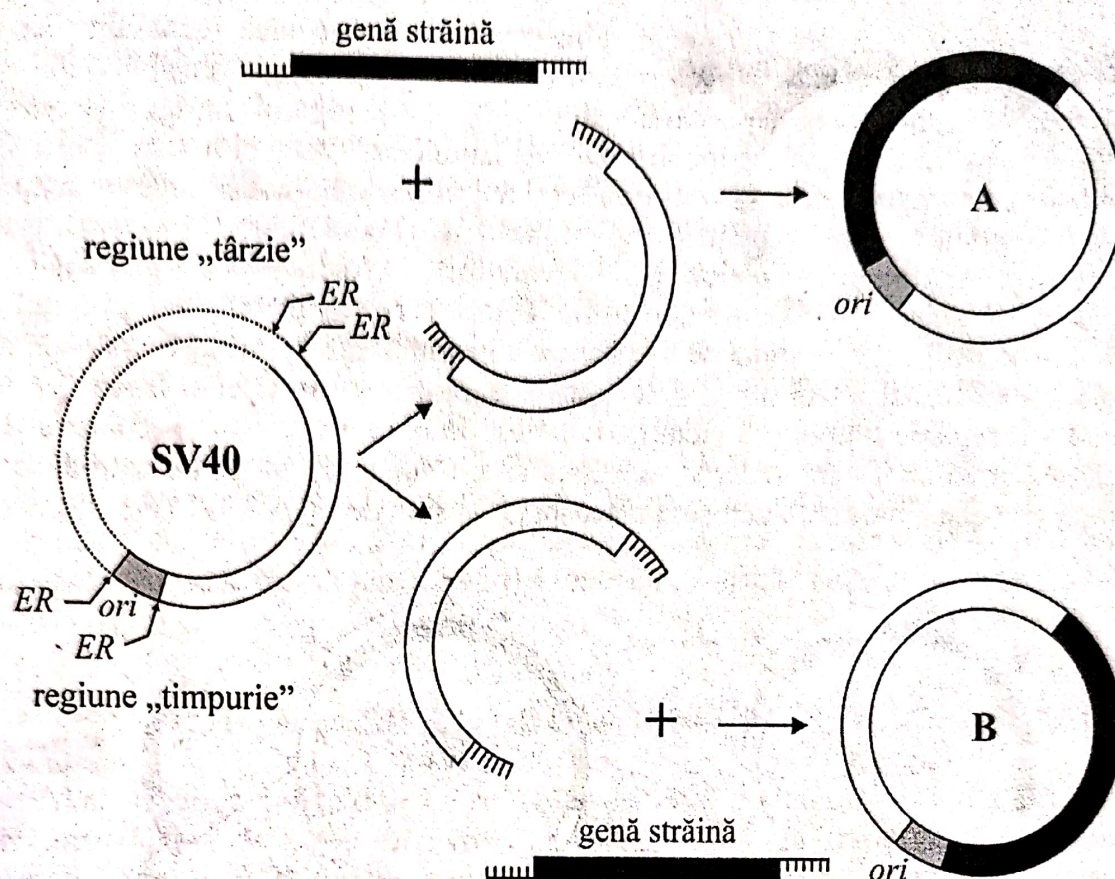


Fig. 37 – Variante de construire a vectorilor derivați de la genomul SV40.

Mulligan și colab. (1979) au obținut un recombinat în care secvența codificatoare pentru proteina de capsidă VP1 a fost înlocuită cu ADNc corespunzător mesagerului genei pentru β -globina de iepure (SVGT5). Propagat în celule permissive de maimuță, prin complementare cu un helper mutant *tsA*, el a permis sinteza unui ARNm 16S, pentru o proteină de fuziune între β -globină și VP1. Dacă insertul este reprezentat de către ADN genomic, el poate fi transcris prin două mecanisme posibile: inițierea sintezei mesagerului de la promotorul târziu al SV40 sau, dacă segmentul genomic conține suficient acid nucleic în amonte de situsul 5'-cap, inițierea poate apărea de la promotorul insertului. Atunci când scopul urmărit este studiul mecanismului de transcriere a insertului, este de dorit ca din construcția vectorului să fie îndepărtați promotorii târzii. În acest caz, se păstrează secvența AATAAA care acționează ca semnal de poliadenilare;

Vectorii în care a fost deletată secvența corespunzătoare regiunii timpurii sunt mai puțin utilizați, deoarece exprimarea are loc la nivele mai scăzute în celulele permissive. Acest tip de vectori a permis dezvoltarea celulelor COS. Linia celulară COS-1 conține o singură copie integrată din regiunea timpurie a ADN SV40. Ele au fost obținute de către Guzman și colab. (1981) prin transformarea celulelor CV-1 (linie permisivă de rinichi de maimuță) cu un mutant SV40, având originea replicării defectivă. Această linie celulară sintetizează antigenul T, deține permisivitatea pentru creșterea litică a virusului și permite replicarea tuturor mutantilor SV40 cu deleții în

regiunea timpurie. Celulele COS sunt utilizate pentru propagarea recombinărilor cu SV40. Sistemul prezintă avantajul eliminării virusurilor helper termosensibile.

Vectorii rezultați din genomul SV40 prin deletarea regiunii timpurii trebuie să aibă un design adecvat pentru localizarea elementelor de control a transcrierii și a semnalelor de *splicing*. Strategia cel mai frecvent utilizată constă în unirea capătului 5' al ADN străin cu situsul pentru enzima *Hind* III (nucleotidul 5171), situat între secvența capping timpurie și codonul AUG, care inițiază traducerea antigenului T.

Berg și colab. (1973) au construit vectori care conțin regiuni plasmidiale derivate de la *pBR322*, o unitate de transcriere a genomului SV40 (în general, unitatea timpurie), modificată astfel încât să asigure – garantat – transcrierea insertului și – opțional – o regiune timpurie intactă derivată tot de la SV40, cu rol în replicare și în sinteza antigenului T. În vederea selecției recombinărilor, se poate introduce în construct și o genă marker. Vectorii din această clasă sunt de tip *pSVGT* (fig. 38).

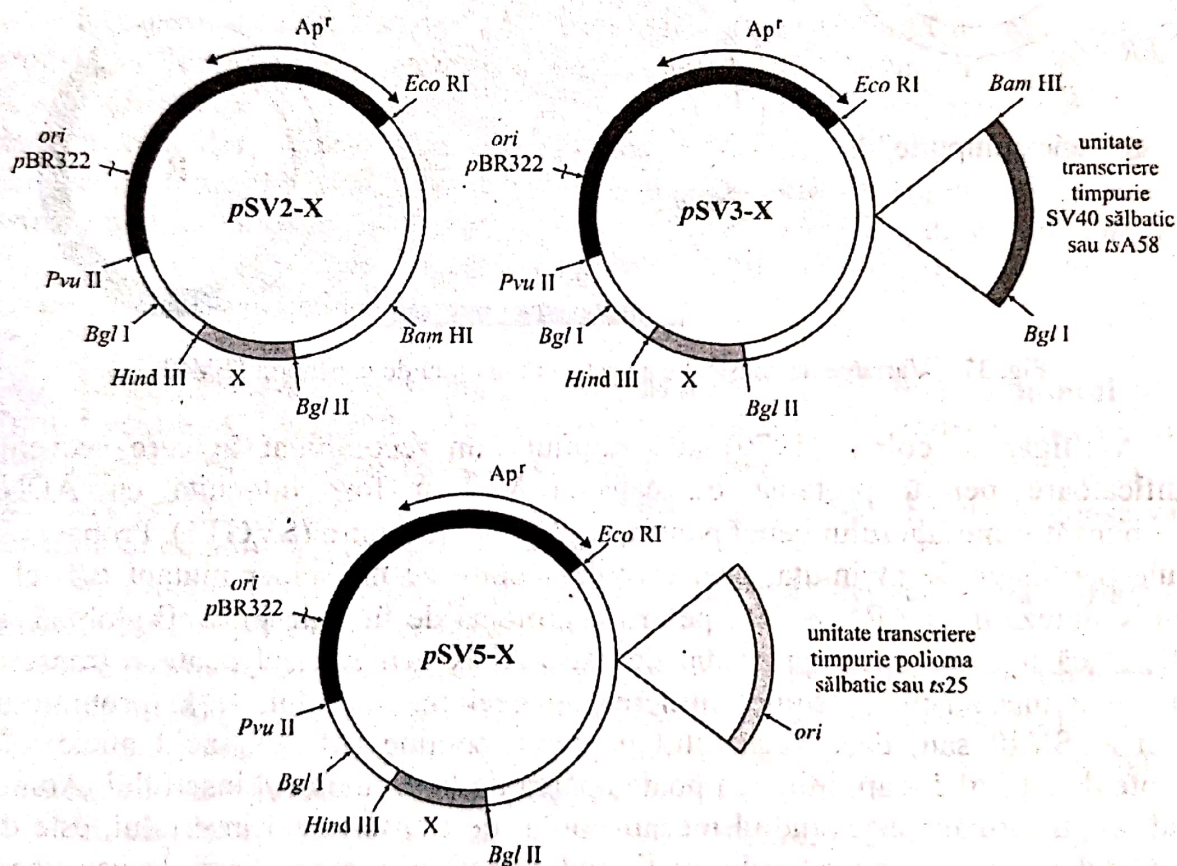


Fig. 38 – Exemple de vectori derivați de la SV40.

pSV2X conține elementele de la *pBR322* în sens antiorar, situate între situsurile pentru *Eco* RI și *Pvu* II (incluzând gena de rezistență la ampicilină și *ori* plasmidială), un segment din genomul SV40 cu promotorul timpuriu și originea replicării virale, fără secvențe care să codifice antigenul T. Gena insert se plasează în amonte de semnalul timpuriu de poliadenilare.

pSV3X și *pSV5X* derivă din precedentul vector, dar au inclusă secvența codificatoare pentru antigenul T. Primul vector se replică în celule simiene, iar cel

de al doilea în linii celulare murine. Pornind de la acești doi vectori s-au construit derivați care conțin și regiunea timpurie a mutantei termosensibile *tsA*, care sunt incapabili să inițieze replicarea la temperaturi nepermissive, la care nici antigenele mutante T nu își pot autoregla propria sinteză.

În ceea ce privește replicarea și exprimarea plasmidelor conținând originea de la SV40 în celulele COS, Myers și Tjian (1980) au remarcat că eficiența depinde de vectorul plasmidial utilizat în construcție. Dacă acesta este *pBR322*, s-a observat existența unor deleții ale secvențelor procariote între gena de rezistență la tetraciclină și *ori pBR322*, care inhibă replicarea în celulele animale. De aceea, în experimentele de transfecție se recomandă utilizarea vectorilor plasmidiali din care a fost îndepărtată această secvență „otrăvită” (vectori *pSV08*, *pSV10* etc.). În acest tip de vectori, prezența antigenului T duce la acumularea unui număr mare de copii/celulă transfectată (200 000 – 400 000), fapt care nu permite stabilirea de linii celulare permanente, întrucât ele nu pot tolera prezența unor nivele atât de ridicate de ADN extracromozomal.

4.3.6. VECTORI DERIVAȚI DE LA VIRUSURI PAPILOMA (PV)

Transformarea morfologică a celulelor de către marea majoritate a virusurilor ADN tumorale și de către retrovirusuri este însoțită de integrarea covalentă a genomului viral în ADN cromozomal al celulei-gazdă. Cercetări relativ recente au arătat că în celulele transformate *in vitro* de către papilomavirusul bovin (BPV) și în tumorile induse de către același virus *in vivo*, genomul se menține în forma sa epizomală, fără decelarea secvențelor virale integrate.

4.3.6.1. Biologia moleculară a virusurilor papiloma. Acestea sunt membri ai familiei *Papovaviridae*, la fel ca și virusurile polioma și SV40, dar au fost mai puțin caracterizate, deoarece nu există sisteme de culturi celulare în care virionii infectanți să poată fi propagați. Sunt virusuri larg răspândite, cauzând apariția unor afecțiuni benigne sau maligne

Până de curând, ADN viral și virionii erau obținuți – cu eficiență scăzută – prin izolare din celulele infectate, dar tehnologia ADN recombinat a permis obținerea genoamelor și a antigenelor virale, în cantități mai mari, în *E. coli*. În acest fel s-a putut determina secvența de nucleotide, ca și structura corespunzătoare genomului viral, care codifică două proteine târzii, structurale, și opt proteine timpurii, cu rol în procesele de replicare și de integrare (fig. 39).

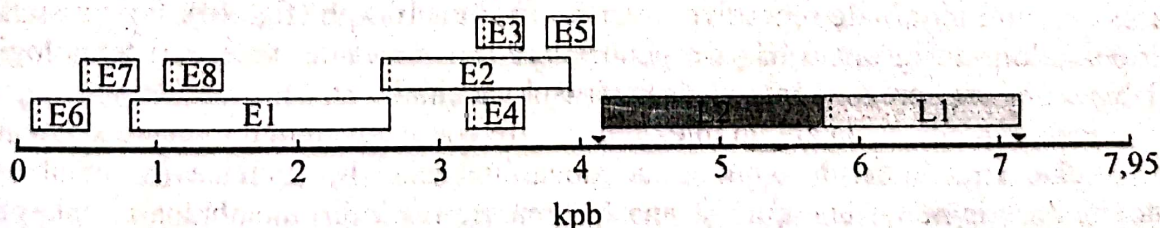


Fig. 39 – Harta genomului papilomavirusului bovin.

4.3.6.2. Strategia de obținere a vectorilor derivați din genomul PV. Lowy și colab. (1980) au arătat că un fragment subgenomic definit (conținând $\approx 69\%$ din genomul BPV-1) are capacitatea de a transforma celule murine *in vitro*. Sarver și colab. (1981) au utilizat acest fragment ca vector pentru introducerea genei preproinsulinei de șobolan în culturi de celule murine, folosind ca marker de selecție transformarea morfologică. Celulele transformate au păstrat recombinatul ca epizom, în circa 100 de copii/celulă. Exprimarea genei preproinsulinei de șobolan este eficientă în aceste celule, iar preproteina este procesată la proinsulină, secretată în mediu, dar nu ca hormon matur. Cartarea transcripturilor a arătat că ei au același capăt 5' ca și ARNm autentic pentru preproinsulina de șobolan, sugerând că transcrierea este inițiată din promotorul insertului, și nu din promotorul BPV.

Deși este singurul caz de utilizare a BPV ca vector, sistemul promite, deoarece moleculele se replică epizomal.

Proprietățile generale ale acestui tip de vectori sunt:

- nivel moderat de exprimare în diferite tipuri de celule mamaliene;
- permit stabilirea de linii celulare care conțin copii multiple ale ADN insert, nefiind utilizabili ca sistem de exprimare tranzitorie;
- nu se pun probleme privind dimensiunea insertului;
- permit exprimarea secvențelor de ADN genomic sau ADNc etc.

4.3.7. VECTORI DERIVAȚI DE LA POXVIRUSURI

Virusul vaccinia, ca toți membrii familiei *poxviridae*, se replică și se exprimă în citoplasma celulelor infectate. Situsul citoplasmatic de transcripție și utilizarea enzimelor codificate de către virus au permis sinteza de vectori derivați de la virusul vaccinal, vehicule care au proprietatea de a exprima gene străine sau ADNc, derivate dintr-o mare varietate de surse procariote, eucariote și virale.

„Popularitatea” acestor vectori se bazează și pe spectrul lor de gazdă, deosebit de larg, ca și pe capacitatea de a integra stabil și de a împacheta ADN insert, fără pierderea infectivității. O limită a vectorilor vaccinali o constituie tendința lor de a liza celulele-gazdă în câteva zile, împiedicând exprimarea recombinatelor pe termen lung.

4.3.7.1. Biologia moleculară a poxvirusurilor. Familia *Poxviridae* cuprinde virusuri care au un virion mare, complex, anvelopat, conținând enzimele necesare sintezei ARNm, un genom ADN dublu catenar cu 130–300 kpb cu capetele legate covalent prin intermediul unei structuri în „ac de păr”. La capetele genomului se găsesc regiuni terminale repetitive inverse, de circa 10 kpb (fig. 40). Poxvirusurile vertebratelor sunt grupate în șase genuri, dar din punct de vedere al tehnologiei ADN recombinat prezintă interes doar virusul vaccinal.

Particula infectantă are un miez (*core*) care conține genomul, precum și enzime și proteine structurale, înconjurate de două învelișuri lipoproteice (o membrană internă, de origine necunoscută și una externă, derivată din membrana citoplasmatică). Capacitatea de codificare a genomului este de aproximativ 200 polipeptide.

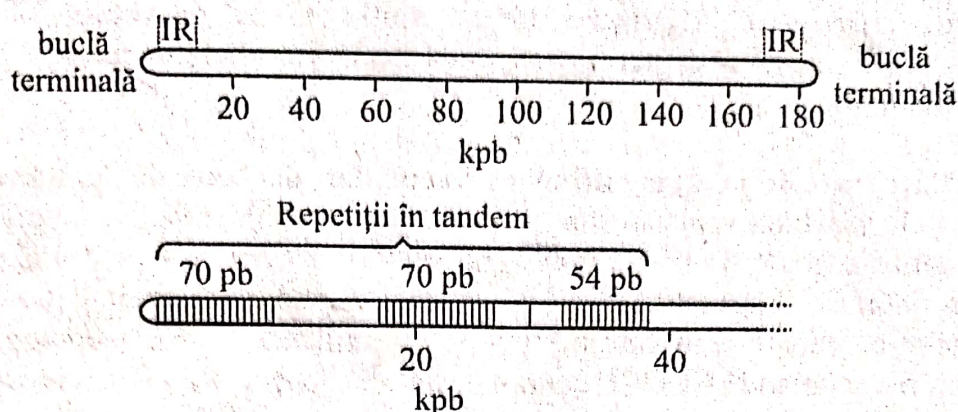


Fig. 40 – Harta genomului poxvirusurilor.

Sinteza ARNm poate fi evidențiată aproape imediat după infecție, toate proteinele necesare fiind prezente în miezul viral. Aceste proteine includ o ARN polimerază-ADN dependentă, un factor heterodimeric de inițiere a transcripției, enzime de 5'-capping și de 3'-poliadenilare a ARNm etc.

Încă nu a fost definită zona corespunzătoare originii de replicare. Ciclul de replicare virală include trei etape (timpurie, medie și târzie), exprimarea secvențială a genelor corespunzătoare fiind mediata de un mecanism în cascadă. Producția timpurie de exprimare cuprind între altele o ADN polimerază și alte proteine necesare replicării genomului, dar și factorii necesari pentru transcrierea clasei următoare de gene (cele medii). După replicarea ADN viral se exprimă genele medii, factori care transactivează transcrierea târzie. Expresia genelor târzii duce la sinteza proteinelor virale structurale majore, a enzimelor aflate în miezul viral, precum și a factorului de transcriere timpurie.

Deoarece poxvirusurile codifică propria ARN polimerază, precum și factorii de transcriere, utilizarea promotorilor virali respectivi este esențială pentru exprimarea eficientă a genelor străine. Promotorii timpurii, medii și târzii au secvențe distincte, care le permit să fie recunoscuți de către factorii de transcriere corespunzători, așa încât momentul exprimării va fi determinat prin alegerea promotorului sub controlul căruia este pus insertul. Promotorii timpurii au aproximativ 30 pb și conțin trei regiuni (o secvență critică de 15 pb, un *spacer* de 11 pb și o regiune purinică de 5–7 pb, inițiatorul transcrierii). Secvența TTTTNT este regăsită frecvent în vecinătatea capetelor genelor timpurii și duce la terminarea transcrierii, cu 30 pb în aval. Dacă această secvență de terminare apare aleatoriu în insert (acesta fiind un inconvenient al vectorilor derivați din vaccinia), ea poate fi eliminată prin mutageneză, fără alterarea specificității codonului de terminare.

Promotorii intermediari au lungimea de 30 pb și sunt divizați și ei în trei segmente (o secvență de bază de 14 pb bogată în A/T, un *spacer* de 11 pb și o secvență inițiator TAAA).

Ca structură primară, promotorii genelor târzii diferă de precedenții, dar cuprind tot trei zone (secvența de bază de circa 20 pb, cu reziduuri consecutive T/A, un *spacer* de 6 pb, conținând regiunea înalt conservată TAAAT și secvența de

inițiere a transcrierii). Mesagerii târzii conțin și ei secvențe TTTTNT, nerecunoscute ca semnal de terminare, ceea ce îi face heterogeni din punct de vedere al lungimii.

4.3.7.2. Strategii pentru obținerea vectorilor derivați de la poxvirusuri.

Unele gene ale virusului vaccinal sunt precedate de un tandem de promotori timpurii și târzii, fapt care poate fi utilizat – în cazul vectorilor derivați – pentru exprimarea continuă a inserțiilor. Deoarece virusul vaccinal nu codifică enzime de *splicing*, genele naturale (care conțin introni) nu pot fi utilizate pentru tehnologia ADN recombinat, se recomandă fie ORF continuu, fie – în special – ADNc (corespunzător ARNm matur).

În mod deosebit, pentru exprimarea tranzitorie a genelor străine – în plasmidele transfectate din celule infectate cu virus vaccinal – pot fi utilizați promotorii intermediari, în prezența unui inhibitor al replicării ADN, pentru blocarea sintezei proteinelor endogene.

Nu se recomandă utilizarea vectorilor derivați de la poxvirusuri în vederea exprimării proteinelor secretoare.

Datorită dimensiunilor mari ale genomului poxvirusurilor, modalitatea uzuală de integrare a genelor străine se face prin recombinare omoloagă *in vivo*. Plasmidele care conțin promotori derivați din genomul poxvirusurilor și insert, aflat sub controlul acestora, flancat de regiuni neesențiale ale ADN poxviral sau de unele regiuni intergenice, sunt transfectate în celule deja infectate cu virusurile corespunzătoare. Segmentele de ADN viral au rolul de a direcționa recombinarea la un situs neesențial din genomul pox. Frecvența de recombinare, mică în general, determinată prin numărul plajelor, depinde de dimensiunile insertului și ale ADN viral care îl flanchează. Recombinații din plaje pot fi identificați prin hibridare sau cu anticorpi specifici, la nivelul produsului de exprimare.

Cercetări din ultimii ani au demonstrat că, la un genom de circa 200 kpb, se pot realiza inserții de 26 kpb, la situsuri unice de restricție (*Not* I sau *Sma* I), eventual în gena TK a acestuia. Ligarea directă conferă avantajul inserării unor fragmente mari de ADN străin, evitând clonarea în vectori procarioti (*E. coli*).

În mod curent, se folosesc tehnicile generale de selecție și *screening*, cea mai des utilizată fiind selecția celulelor TK⁻: metoda se bazează pe inserția genei străine în ORF TK al virusului vaccinal, cu inactivarea inserțională a acesteia. În prezența analogului nucleozidic 5-bromdeoxiuridină, recombinatii formează plaje în monostratul de celule TK⁻; virusul sălbatic nu formează plaje, deoarece fosforilarea nucleozidului duce la încorporarea lui, letală pentru virus. Întrucât pot apărea și mutante spontane TK⁻ (care pot forma plaje), prezența insertului trebuie confirmată prin PCR sau hibridizare (fig. 41).

O altă metodă de selecție, bazată tot pe inactivarea inserțională, constă în plasarea insertului în interiorul genei virale pentru hemaglutinină, ceea ce anulează această proprietate a recombinatului.

Prin cotransferul genei *lacZ* împreună cu insertul, este posibilă identificarea pe seama culorii albe/albastre a plajelor, după adăugarea substratului.

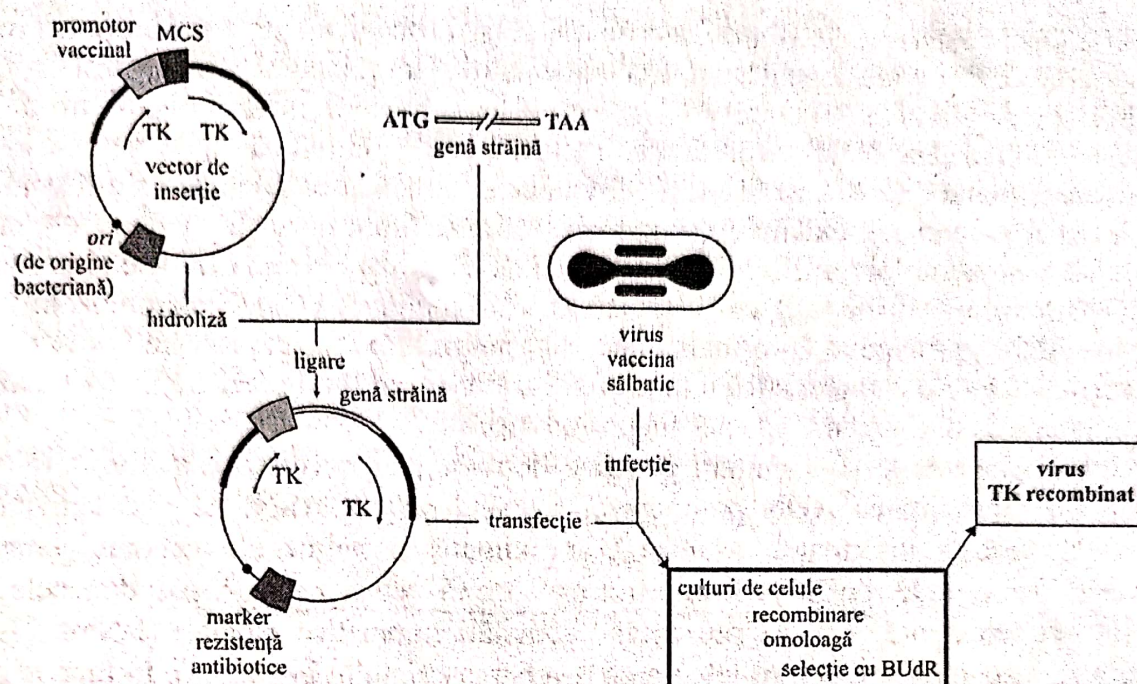


Fig. 41 – Tehnici de selecție și screening prin inactivare inserțională, pentru recombinanți derivați de la poxvirusuri.

Cele mai noi virusuri vaccinale recombinante conțin o subunitate a genei ARN polimerazei T7, ceea ce permite ca celulele infectate cu recombinat să sintetizeze o polimerază fagică funcțională, care poate transcrie genele reglate de promotorul T7 fie dintr-o plasmidă, fie din interiorul recombinatului ca atare. Utilizarea acestui sistem de transcriere necesită modificarea capătului 5' al transcripturilor realizate sub acțiunea polimerazei fagice. Când se urmărește exprimarea în cantitate mare a genei de interes, insertul aflat sub controlul promotorului T7 este clonat într-un al doilea virus vaccinal recombinat. Incapacitatea de a integra stabil atât ARN polimeraza T7, cât și promotorul acesteia în același recombinat a fost depășită prin încorporarea genei represorului *lac* din *E. coli* în genomul virusului vaccinal și plasarea polimerazei sub controlul operatorului amintit.

S-a demonstrat că vectorii vaccinali induc același răspuns umoral la genele omoloage, dar și la cele heteroloage (insert) (Verardi și colab., 2001).

Cercetările recente se axează pe utilizarea avipoxvirusurilor ca vectori non-replicativi în celule de mamifere, mai ales din rațiuni de securitate. Acest tip de vectori nu asigură exprimarea transgenică *in vivo* decât pe termen scurt (1–4 săptămâni), probabil datorită „saturării” celulei-gazdă cu particule virale, care vor fi eliminate prin intervenția unor mecanisme imune.

4.3.8. RETROELEMENTE

S-a postulat că primele molecule autoreplicative ale mediului prebiotic au fost de tip ARN, teorie care a câștigat teren o dată cu descoperirea proprietăților enzimatică ale acestora. S-a dovedit că multe molecule de tip ribozim au activități

polimerazice, ligazice, de RNaze sau de *splicing*. Probabil că un ribozim primitiv a servit el însuși ca matriță pentru sinteza autocatalitică a moleculei complementare. Ca model a fost propusă structura ARNt; astfel, moleculele actuale de acest tip ar fi relicve ale unui „big bang” evoluționist. Pentru a ajunge la lumea ADN, se pare că a fost „achiziționată” o RTază și, deși activitatea enzimatică respectivă nu a fost încă identificată în ribozim, exemple privind aceasta apar timpuriu în filogenie. Cele mai vechi retroelemente par a fi retronii bacterieni, telomeraza, retroplasmidele și intronii mobili din mitocondriile fungice. Telomeraza, care prelucrează capetele cromozomilor, conține ARN, participând la formarea unei „mașinării” ribonucleoproteice. Activitatea telomerazică este o caracteristică a tuturor eucariotelor, ea fiind prezentă încă de acum 1,8 milioane de ani, precedând apariția primelor celule.

Retroelementele sunt entități genetice derivate prin reverstranscrierea ARN în ADN, fie sub acțiunea ADN polimerazei folosind *primer* ARN, fie prin activitate RTazică. Această informație însumează aproximativ o treime din genomul uman, incluzând secvențele repetitive *Alu*, retrotranspozonii, retrovirusurile, pseudogenele și diferite retroelemente celulare, prezentând activități enzimatic asociate (RNaza H și integraza, răspunzătoare pentru integrarea reverstranscriptului în genom). În funcție de proprietățile lor, retroelementele au fost subdivizate în superfamilii virale și nonvirale.

Temin a sugerat că retrovirusurile au evoluat ca elemente celulare mobile genetic. O altă variantă în ceea ce privește evoluția retroelementelor se bazează pe ideea invadării genomului de către retrovirusuri și pe degenerarea acestuia, dar nu poate explica vechimea acestor elemente.

4.3.9. VECTORI DERIVAȚI DE LA RETROVIRUSURI

În 1911, Rous a constatat că apariția fibrosarcomului se datorează prezenței unui element ultrafiltrant, denumit astăzi RSV (*Rous sarcoma virus*). Acesta este un retrovirus, un „vector” natural care – între alte elemente – conține oncogena celulară *src* recombinată *in vivo* cu tulpina sălbatică a virusului leucozei aviare. Virusurile tumorale ARN, între care și RSV, au devenit instrumente în studiul oncogenezei și al mecanismelor creșterii celulare. Baltimore și colab. (1970) au raportat pentru prima oară prezența activității RTazice virale, ceea ce a dus în final la modificarea dogmei centrale a biologiei moleculare și la începerea erei retrovirusologiei, cu efecte profunde asupra investigațiilor în carcinogeneză, în evoluție și în terapie genică. Vectorii retrovirali permit transferul de gene în celule refractare la alte metode de transformare, nediscriminând între celulele care cresc în suspensie și cele aderente. Sistemul de transfer este bipartit, constând din vector și o linie de celule de împachetare, care furnizează proteinele necesare încapsidării particulei infectante și integrării ca ADN în genomul celulei țintă.

4.3.9.1. Biologia moleculară a retrovirusurilor. Familia *Retroviridae* include virusuri al căror ciclu de replicare se distinge prin conversia genomului lor ARN în ADN, sub acțiunea RTazei. ARN retroviral (9–10 kb) se află într-o capsidă

învelită în formațiuni de origine celulară. În capsida virală (al cărei polipeptid de miez/core este codificat de gena *gag*) sunt împachetate două copii pozitive ale genomului ARN, împreună cu RTază și cu un *primer* celular ARNt. La capete, genomul viral are două regiuni terminale repetitive (LTR), care flanchează cele trei gene structurale (*gag*, *pol* – RTază și integrază, *env* – proteinele de anvelopă). Siturile de legare a primerului pentru reverstranscriere (PBS- și PBS+) sunt localizate adjacent LTR. Transcrierea este inițiată din interiorul 5'LTR (care conține în *cis* elementele *enhancer* și promotor) și se termină la situsul de poliadenilare din 3'LTR. ARNm transcris integral poate fi utilizat ca genom viral pentru încapsidare (întrucât conține semnalul Ψ , specific procesului) sau poate servi la exprimarea genelor *gag* și *pol*. Gena *env* este tradusă dintr-un mesager subgenomic, apărut prin splicingul între situsurile donor SD și acceptor SA ale transcriptului primar (fig. 42).

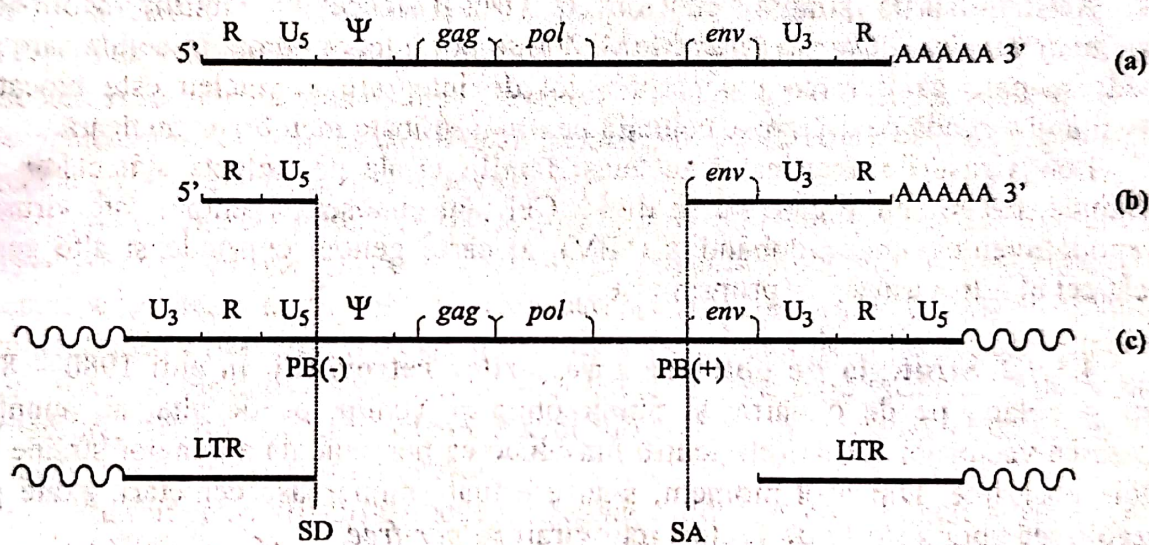


Fig. 42 – Harta genomului retrovirusurilor.

Procesul de integrare a provirusului în genomul gazdei include – pe lângă selecția și clivarea unui situs în ADN celular (cu extensii 5') – recunoașterea secvențelor de integrare din LTR, cu digestia endonucleolitică a acestora pentru formarea extensiilor 3'OH (aparitia de capete coezive). Sinteza ADN proviral (catena negativă) de către RTază începe de la primerul ARNt spre regiunea repetitivă R (capătul 5' al genomului); activitatea de RNază H clivează matrița ARN, eliberând capătul 3' al ADN născând liber, sărind la același nivel al celei de a doua copii R (din aceeași moleculă sau dintr-o moleculă diferită de ARN). Sinteza continuă de la capătul 3' al genomului. Acest ARN servește ca *primer* pentru sinteza catenei pozitive. Între timp, continuă sinteza catenei negative, cu copierea ARN viral, până când se ajunge la situsul de fixare a primerului ARNt. Prin hibridizarea celor două catene ADN în regiunea corespunzătoare ARNt, continuă sinteza catenelor, rezultând două copii complete ale LTR. Mecanismul ingenios de replicare a ADN retroviral permite genomului să se copieze complet, incluzând și

promotorul ARN polimerazei II (Pol II). Astfel, o consecință a întregului proces este capacitatea de mobilizare a elementelor promotor ale Pol II ca parte a ARN. În acest proces, promotorul este copiat din secvențele U3 localizate în 3'LTR.

Ca urmare a activității RTazei rezultă câteva conformații de ADN retroviral, inclusiv unele circulare cu unul sau două LTR, precum și altele liniare, cu LTR la ambele capete. Substratul pentru integrare (proces semialeatoriu, anumite situsuri fiind utilizate cu o frecvență mai mare) este reprezentat de către forma liniară. Din provirusul integrat se transcrie ARNm, tradus la proteinele virale.

Genoamele retrovirale sunt constituite din gene structurale (*trans*-activatoare) și semnale ADN de recunoaștere (*cis*-activatoare), necesare pentru transcrierea genomului, pentru reverstranscriere, pentru integrare și pentru împachetare. Esența sistemului retroviral este diviziunea funcțiilor *cis*- și *trans*-activatoare în două sau mai multe părți separate.

Retrovirusurile simple, cum ar fi virusul leucemiei murine Molloney (*Molloney murine leukemia virus* MoMLV), se pot integra numai în celule care se divid; se pare că intrarea precomplexului de integrare în nucleu este blocată, necesitând o rundă de diviziune celulară pentru a străbate membrana nucleară.

Lentivirusurile aparținând aceleiași familii virale pot infecta atât celule în diviziune, cât și celule care nu se divid. Cel mai cunoscut exemplu este virusul imunodeficienței umane dobândite (HIV), al cărui genom cuprinde și alte gene decât cel al retrovirusurilor propriu-zise.

4.3.9.2. Strategia de obținere a vectorilor retrovirali. În anii 1980 – 81, Wei și colab., pe de o parte, și Shimotohno și Temin, pe de alta, au anunțat utilizarea vectorilor retrovirali pentru introducerea permanentă a genelor străine în celule eucariote. Din acel moment, s-au efectuat numeroase cercetări, axate pe dezvoltarea unor sisteme de vectori retrovirali *helper-free*.

Vectorii derivați din genomul retroviral sunt singurii capabili de integrare permanentă a alogenelor. Se ridică însă o serie probleme, majoritatea legate de inactivarea LTR, de inactivarea retrovirală în cursul embriogenezei la animale transgenice, de incapacitatea retrovirusurilor de a infecta celule care nu se divid.

Caracteristicile retrovirusurilor care justifică alegerea lor ca vectori de integrare și exprimare sunt următoarele:

- genomul relativ mic, care poate fi manipulat cu ușurință, astfel încât eventualele defecte rezultate din replicarea virală să poată fi complementate în *trans*;
- cunoașterea hărții fizice a genomului unor retrovirusuri;
- existența unor elemente *enhancer* puternice (pentru exprimare adecvată) și posibilitatea de cultivare, cu obținerea de titruri ridicate (o singură copie de ADN viral devine integrată stabil în genomul gazdă, permițând exprimarea insertului).

Astfel, vectorii retrovirali (*cis*-activatori) și genele *helper* (*trans*-activatoare, structurale) sunt două componente esențiale ale sistemelor retrovirale utilizate curent. Acestea transmit insertul *via* elementelor *cis*-atașate din celulele purtătoare ale genelor *helper* integrate (necesare pentru obținerea virionilor retrovirali).

Genele vectorului rămân în celula gazdă, în stare competentă non-replicativă. Dezavantajul acestui procedeu constă în faptul că celulele *helper* sunt sursa unor evenimente de recombinare nedorite, la fel ca și unele retrovirusuri endogene sau retroelemente celulare, care pot fi eventual transmise în cursul terapiei genice.

Vectorul retroviral trebuie să conțină în *cis* secvențele necesare replicării eficiente, dar restul secvențelor virale pot fi delete. Astfel, structura provirusului (ADNc) este gata adaptată pentru construcția vectorului, întrucât zonele reglatoare în *cis* sunt situate la extremități și segregate față de cele în *trans*. Insertul/insertii pot lua locul genelor reglatoare, iar prezența unor situsuri de restricție facilitează clonarea genelor străine.

Elementele *cis*-activatoare necesare unui vector retroviral sunt: regiunile repetitive R, U5, situsurile de integrare *attr* și *attL*, situsurile de legare a primerului la catena – (sau situsul de legare a ARNt) și la catena + (sau secvența polipurinică PPT), semnalul de împachetare ψ , situsurile de clonare și de procesare 3'ARN. Vectorii de acest tip au promotorul viral integral (în U3), o regiune U5 (5' netradusă), precum și secvențe adiționale ($\psi+$), care cresc eficiența transmiterii. Prezența acestor secvențe elimină separarea completă a elementelor *cis* de cele *trans*, îndeosebi pentru genele *gag-pol* și *env*, parțial suprapuse.

Într-un alt caz, există diferențe între vectorul retroviral ideal, care evită recombinarea omoloagă, și un vector tipic eficient. O posibilă îmbunătățire a strategiei de separare a elementelor *cis*- și *trans*-activatoare constă în utilizarea vectorilor compatibili cu *helperul*, dar care nu conțin gene retrovirale și nu prezintă omologie cu zone *trans*-activatoare. Elementele virale esențiale pentru replicarea și integrarea acestor virusuri defective sunt furnizate în *trans* de un virus *helper* non-transformant, competent replicativ.

Studiul retrovirusurilor acut oncogene a dovedit că, cel mai adesea, genele nou achiziționate sunt fuzionate *in frame* cu regiunile codificatoare retrovirale, astfel încât proteinele transformante sunt proteine de fuziune. Cu o singură excepție (RSV), toate retrovirusurile oncogene sunt defective replicativ, oncogenele celulare substituind secvențele virale care codifică funcțiile de transactivare. Designul vectorilor retrovirali trebuie să urmeze această strategie naturală și să ducă la obținerea unui vehicul defectiv replicativ (ceea ce asigură inclusiv securitatea în manipulare), care să permită complementarea funcțiilor replicative în *trans*. În practică, aceste funcții auxiliare pot fi realizate de un virus *helper* sau de celule *helper* („inginerizate”, care găzduiesc un provirus mutant, inapt să se împacheteze singur în virionul matur).

Utilizarea vectorilor retrovirali este limitată de o serie de factori, cum ar fi:

- tendința de a genera retrovirusuri competente replicativ (RCR);
- fidelitatea limitată a RTazei;
- limita de încărcare maximă a vectorului (până la 10 kpb);
- inactivarea lor rapidă în ser, *in vivo*;
- capacitatea de a infecta numai celule în diviziune;

- inactivarea transcripțională a LTR;
- controlul limitat al transcripției din LTR.

Probabilitatea producerii de RCR poate fi minimizată prin eliminarea omologiei între vector și componentele *helper* sau poate fi eliminată complet prin utilizarea particulelor sintetice, de transport lipozomal sau sub forma altor molecule conjugate (virozomi), conținând vectorul și enzimele necesare pentru integrare.

4.3.9.3. Tipuri de vectori retrovirali. Spre deosebire de bacteriofagi, unde asamblarea se realizează extracelular, producția de recombinanți retrovirali are loc numai în celule intacte. În practică, se utilizează numai vectori defectivi replicativ, pentru transducția celulelor infectate anterior cu un virus *helper*, competent replicativ, sau a liniilor de celule de împachetare. Spectrul de gazdă al virusului parental este una dintre determinantele majore în alegerea liniei de împachetare.

Un exemplu de vector retroviral îl constituie *pMX 1112*, bazat pe scheletul genomului MoMLV, în care genele structurale au fost substituite cu un polilinker susceptibil la restricția enzimatică; exprimarea insertului se face sub controlul promotorului din 5'LTR. Dezavantajul major al acestui tip de vectori îl constituie imposibilitatea selecției recombinanților, în cazul în care acesta determină un nou fenotip. Soluția pentru selecția celulelor transfectate sau infectate o constituie plasarea în același construct a unei a doua gene, care codifică pentru un anumit marker de selecție. În toți acești vectori gena proximală 5'LTR este exprimată din transcriptul primar (ARN genomic întreg); pentru exprimarea genei distale se pot folosi:

- ARN subgenomic, format prin splicingul ARN viral; în acest caz, vectorul utilizează situsurile SD și SA, exprimând gena distală din mesagerul genei *env*;
- un promotor intern, inserat în vector; deși inserția acestuia se poate face în oricare din sensuri, orientarea inversă alterează producția de virioni, ca rezultat al interferenței transcripționale din promotori opuși. Avantajul unui asemenea design îl constituie faptul că gena heteroloagă își poate păstra propriul semnal de poliadenilare.

Vectorul N2, derivat tot de la MoMLV, este unul dintre cei mai des folosiți, mai ales de când s-a descoperit că pentru asigurarea unui titru ridicat este necesară jumătate din gena *gag*. Suprapunerea ei cu cea corespunzătoare a *helperului* duce la obținerea de RCR, de nedorit în testările clinice. Vectorul LN și omologii săi (fig. 43), derivați din N2 prin eliminarea codonilor de start CTG și ATG ai genei *gag* și a unui codon stop UAG, previne ca recombinanții *gag* să participe la formarea RCR.

Vectorul G1Na (Genetic Therapy Inc.) conține un linker pentru clonarea genelor de interes și un situs criptic de *splicing*, care precede gena de selecție la neomicină, ceea ce face să crească nivelul de exprimare a proteinei heteroloage.

Se pare că sinteza proteică la nivele scăzute, obținută din vectorii retrovirali, poate fi inițiată de codonii de start ATG din regiunea 5' netradusă, ceea ce face dificil pentru ribozomi să execute traducerea genelor aflate în aval de aceștia.

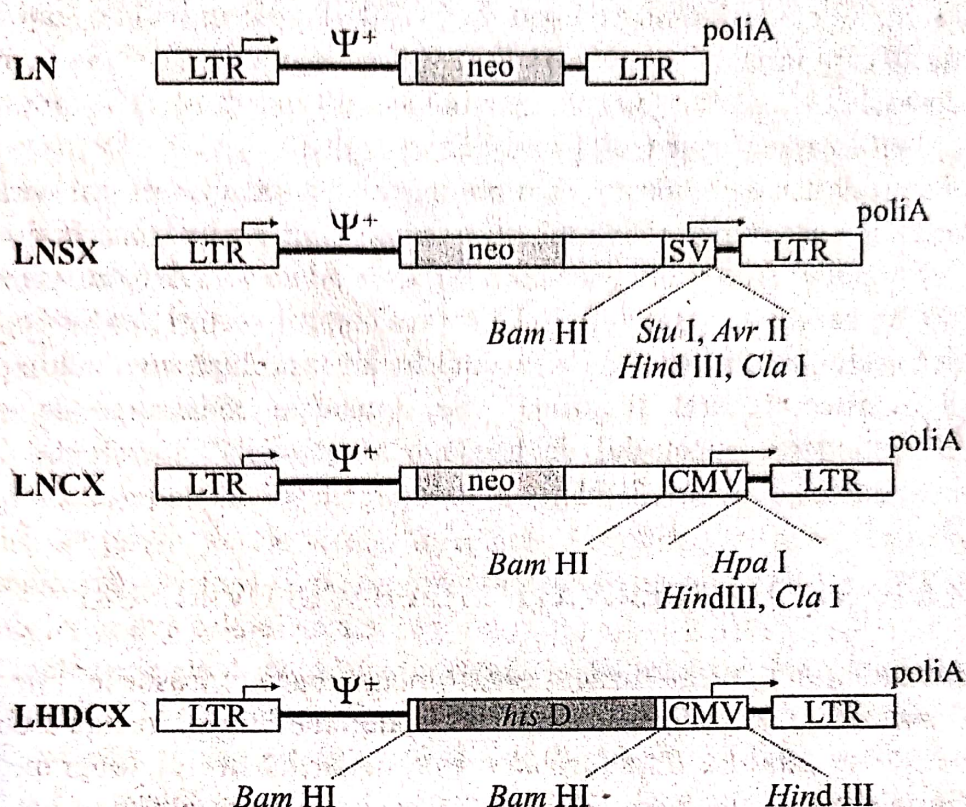


Fig. 43 – Exemple de vectori retrovirali.

Pentru asigurarea unui domeniu de aplicabilitate cât mai larg, în structura unor vectori retrovirali a fost inclusă originea de replicare a unor plasmide bacteriene sau chiar a virusului SV40, care permite fuziunea cu celule COS. Un astfel de vector folosit încă, dar ușor demodat, este BAG, care conține pe lângă elementele retrovirale și gena β -gal, originea de replicare a SV40 și promotorul din regiunea timpurie de transcriere, gena *neo* și originea de replicare bacteriană. Exprimarea din LTR poate fi pusă în evidență prin colorație cu X-gal, în timp ce promotorul SV40 permite și exprimarea *neo* în bacterii.

Una din problemele ridicate de vectorii retrovirali care conțin inserate două gene este imposibilitatea de a le transcrie și a exprima simultan cu aceeași eficiență (mai ales în cazul celor a căror exprimare este dirijată din promotori interni). Regulile care guvernează splicingul ARN sunt insuficient cunoscute; s-a observat că secvențele situate în amonte de situsul de clonare pot afecta formarea ARN subgenomic, din care se exprimă gena situată în aval. Insertul trebuie să fie reprezentat de o copie ADNc a ARNm matur, fără semnal de poliadenilare. Din această categorie de vectori pot fi amintiți LX, rkat, pCL.

Vectorii retrovirali de ultimă generație (Ismail și colab., 2000) au un design care le permite includerea intronilor; în esență, ei se bazează pe capacitatea genoamelor retrovirale de a copia în cursul replicării nu numai promotorul U3, ci și

unele situsuri sintetice de *splicing*, situate în 5'LTR. Transcriptii sintetizati conțin situsul donor 5', care interacționează cu cel acceptor „inginerizat”, situat în aval de situsul de împachetare. Acești vectori asigură un nivel ridicat de exprimare al transcriptilor prelucrați aproape total prin *splicing*.

Până în prezent a fost construită o mare varietate de vectori retrovirali: cu promotori în LTR, cu promotori interni, cu gena de interes exprimată în orientare inversă, cu autoinactivarea LTR (denumiți SIN, *self-inactivating*), cu promotori *pol III* și *pol I*, cu casete de exprimare în LTR (așa numiți vectori *double-copy*), cu LTR modificate etc., realizarea lor însemnând încă – așa după cum s-a exprimat Jolly – „un amestec de artă și știință”. Se urmărește construirea de vectori retrovirali cu extinderea spectrului de gazdă, cu potențială utilizare în țintirea anumitor gene (Barsov și colab., 2001).

4.3.10. VECTORI DERIVAȚI DE LA BACULOVIRUSURI

Considerate a nu avea gazde nonartropode, baculovirusurile infectează majoritatea insectelor, iar utilizarea lor în studii de laborator nu reclamă condiții de lucru restrictive. Familia *Baculoviridae* este împărțită în trei subgrupe, între care așa numitele NVP (*nuclear polyhedrosis viruses*), care pot avea un singur virion (SNVP) sau virioni multipli (MNVP), ocluzivi în interiorul polihedrinei, o proteină nucleară cristalină. Cele mai studiate și mai utilizate baculovirusuri MNVP în tehnologia ADN recombinat sunt: AcMNPV (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) și BmNPV (*Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus*), amândouă având un genom de 128 kpb, al doilea prezentând circa 90% omologie cu primul.

4.3.10.1. Biologia moleculară a baculovirusurilor. Acestea au aspect de baghetă (*rod-shape*), cu un diametru de 200–400 nm; lungimea lor poate fi extinsă în funcție de necesități. Capetele capsidelor sunt diferite din punct de vedere structural, ceea ce le conferă o anumită polaritate. Genomul baculoviral este dublu catenar, CCI, cu o lungime de 80–200 kpb (fig. 44). ADN respectiv este condensat cu proteine, între care predomină un polipeptid asemănător protaminei (p6.9 sau VP12). Nucleocapsidele pot înmuguri prin membrana plasmatică a celulelor sau pot achiziționa anvelopa în interiorul nucleului, unde sunt produse.

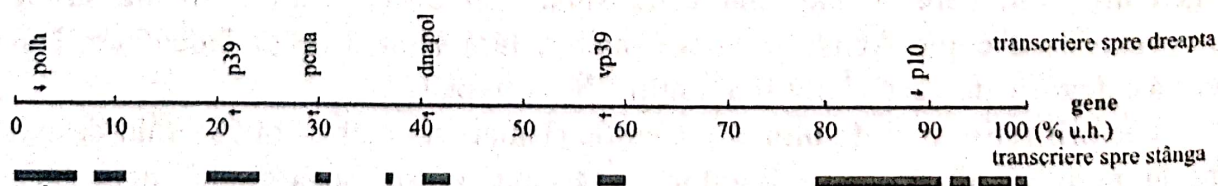


Fig. 44 – Harta genomului baculoviral.

Învelișul virionilor împachetați sub forma incluziilor acoperă perfect nucleocapsida. Nucleocapsidele învelite în membrană sunt virioni, pe când formele înmugurite din membrana plasmatică sunt cunoscute ca *virus extracelular non-ocluziv* (NOV) sau virus înmugurit (BV, *budding virus*). Corpii virali ocluzivi sunt formați în nucleu și conțin nucleocapside cu înveliș (matrice proteică cristalină), formând corpi poliedrozici cunoscuți ca *polyhedral occlusive viruses* (OVS).

Replicarea în culturi de celule se realizează printr-un ciclu în trei faze:

- timpurie;
- târzie (perioada de replicare extensivă a ADN viral, cu exprimarea genelor târzii și producția BV);
- faza foarte târzie (apare procesul de ocluzie, cu elaborarea în interiorul nucleului a componentelor membranei de înveliș). Faza ocluzivă se caracterizează prin absența producției de virioni infectanți. Pe măsură ce apare ocluzia, în nucleu se acumulează structuri fibrilare, reprezentate de un polipeptid de 10 kDa (p10), cu rol probabil în liza celulei gazdă.

Unele gene ale AcMNPV sunt esențiale pentru replicarea virusului, dar multe altele pot fi deletate pentru obținerea vectorilor recombinanți. Transcrierea lor se face în cascadă, de la cele timpurii la cele foarte târzii. Promotorii târzii și foarte târzii sunt compacti și rămân funcționali, chiar dacă sunt mutați în alt loc de pe genom (de exemplu, *polh* și *p10*). Transcriptii târzii sunt molecule ARN 5'-coterminale cu capete 3' diferite, datorită faptului că mașinăria de transcriere nu recunoaște eficient semnalele de poliadenilare și/sau de terminare.

Harta fizică a genomului de AcMNPV nu a fost secvențializată total, dar se remarcă prezența a numeroase situsuri pentru *Eco* RI în cinci localizări de pe genom, regiuni omoloage între ele și denumite *hr*. Ele acționează ca *enhanceri* pentru unii promotori timpurii și, probabil, joacă un rol în replicarea ADN viral. Nu se cunoaște încă originea de replicare virală, iar în ceea ce privește distribuția genelor se constată că ORF sunt foarte apropiate de-a lungul genomului, regiunile reglatoare ocupând dimensiuni minime. Secvențele dintre ORF sunt bogate în A+T, fapt legat de funcțiile promotorilor și terminatorilor transcripționali.

4.3.10.2. Strategia de obținere a vectorilor derivați de la baculovirusuri.

Biologia procesului infecțios în larvele de insecte subliniază utilitatea baculovirusurilor ca vectori de exprimare. Vectorul AcMNPV poate infecta diferite tipuri de celule de insecte, iar genele insert se exprimă de obicei sub controlul promotorului poliedrinei.

În general, vectorii baculovirali exprimă la nivel foarte ridicat proteina de interes (10–100 mg/10⁹ celule). Se preferă utilizarea promotorilor târzii (*polh* și *p10*), activați în cursul fazei unice de ocluzie, astfel încât interferența cu producția de BV să fie minimă. Insertul poate atinge chiar mai mult de 100 kpb,

ceea ce face ca numărul genelor exprimate să fie mai mare de două. Pentru inserții mari este însă necesară construirea unei serii de plasmide de transfer, limitare care se datorează fragilității ADN cu moleculă mare *in vitro* și nu sistemului vector *per se*. Inserția genelor străine în acești vectori se face prin înlocuirea alelică a unei gene virale. Strategia se bazează pe ligarea genei heteroloage într-o plasmidă de transfer, în aval de promotorul viral dorit; gena este flancată de ambele părți de secvențe virale care ținesc o regiune genomică și un promotor particular din ADN viral. Plasmida și ADN parental viral sunt cotransfectate în celulele de insecte, iar enzimele celulare recombina cele două molecule ADN. Înlocuirea alelică implică două evenimente de recombinare omoloagă distinctă, câte unul pentru fiecare din cele două regiuni ale ADN viral care flanchează insertul în plasmida de transfer. Dacă plasmida conține suficiente secvențe de flancare pentru a furniza o copie intactă a genei virale la unul din capetele de inserție, acest tip de recombinat nu disrupe funcția genei virale. Cea mai bună metodă de a distinge recombinatii este alegerea unui design care să conțină un marker, capabil să confere o caracteristică vizibilă a plajelor (de exemplu, secvența *lacZ* din *E. coli*). Se recomandă ca markerul să aparțină vectorului viral și nu plasmidei de transfer.

Gena poliedrinei (*polh*) este neesențială pentru replicarea virală în culturi de celule, deși nivelul său de exprimare este ridicat. De aceea, designul de bază al primilor vectori de origine baculovirală înlocuia această genă cu una heteroloagă, sub controlul promotorului *polh*. Avantajul constă în faptul că recombinatul se replică normal ca BV în culturi de celule, putând fi vizualizat ca fenotip ocluziv negativ (*occ*⁻). Acești recombinati au dezavantajul că nu persistă în mediul de cultură și nu sunt eficienți la infectarea larvelor pe cale naturală, orală. Vectorii de transfer care facilitează inserția genelor heteroloage la un situs adecvat în locul genelor poliedrinei sau *p10* permit fie obținerea de proteine de fuziune (cu secvențe N-terminale ale genelor virale menționate), fie a proteinelor mature nefuzionate.

Deoarece sistemul baculoviral permite *splicingul*, avantajele utilizatorilor sunt maxime, întrucât permite realizarea de modificări posttranslaționale ale heteroproteinei de interes; se asigură plierea adecvată a proteinelor generate de insert, formarea punților disulfurice, oligomerizare și/sau clivare, fosforilare, glicozilare, acilare, carboximetilare etc., necesare activității biologice optime a acestor molecule.

4.3.10.3. Tipuri de vectori baculovirali. Există foarte multe plasmide de transfer care utilizează promotorii *polh* și *p10*: unele au proprietăți unice, fiind capabile să exprime mai mult de o genă heteroloagă (*dual-gene transfer plasmid*), prin utilizarea plasmidelor care au promotorul *polh* pentru construcția de vectori

occ⁺, sau să exprime genele ca produși de fuziune cu alte secvențe N-terminale (plasmide cu ATG suplimentar). Exemple de plasmide din prima clasă ar fi *pAcYM1* sau *pMB030*, iar din a doua clasă – *pVL941*, *pAcC4* etc. În stadii târzii ale replicării, promotorul *p10*, comparabil ca tărie cu *polh*, produce o proteină cu structură fibrilară. Acest tip de promotor se găsește în plasmide cum ar fi *pAcAS2*, *pAcUW1*, *pEP252* etc.

Vectorii baculovirali sunt *helper*-independenți, dar obținerea sistemului necesită circa 6 săptămâni. Cei derivați de la AcMNPV sunt de preferat, liniile celulare pentru replicare (seria SF9-21) având caracteristici superioare de creștere și asigurând nivele ridicate de exprimare. Genele pot fi exprimate și din virusuri *occ*⁻ sau *occ*⁺, folosind o varietate de promotori și strategii de infecție.

Vectorii BmNPV cultivați pe liniile celulare BmN4 au avantajul replicării într-un interval de timp mai scurt, dar sunt limitați la exprimarea unei singure gene, ca atare, sau ca proteină de fuziune cu poliedrina, în virus *occ*⁻.

În cei mai mulți recombinanți, ADN care flanchează insertul are câte 2–4 kpb de fiecare parte a acestuia. Dacă vectorul viral este liniarizat la situsul țintă, proporția de recombinat crește de 10–30 de ori, comparativ cu vectorul circular.

Dintre vectorii de transfer AcMNPV, cei mai cunoscuți sunt:

- *pAcYM1* – care conține întreg promotorul poliedrinei, secvențe netranslate până la poziția +1 (situsul de start al translației) și un situs de restricție (*Bam* HI) pentru a facilita inserția genei străine. Codonul de start ATG al poliedrinei trebuie suplinit cu cel al insertului. Aproximativ 3kpb din secvența genomului baculoviral flanchează de o parte și de alta insertul pentru a facilita recombinația omoloagă.

- *pEVMXIV* – care asigură exprimarea insertului sub controlul promotorului modificat al poliedrinei. Conține un polilinker în poziția +1.

- *pVL1393* – care are codonul natural de translație al poliedrinei modificat din ATG în ATT. Inserția secvenței heteroloage se face la situsul +35 din gena poliedrinei.

- *pBlueBac2* (Invitrogen) – care conține gena *lacZ* translată dintr-un al doilea promotor viral (*etl*), iar *pAcDZ1* are aceeași genă sub controlul promotorului non-viral *hsp70* al *Drosophilei*, activ în celule de insecte. Prin recombinație omoloagă se va obține o moleculă care are și gena *lacZ* utilă în *screening*. *pBlueBac2* are codonul de start mutant al translației poliedrinei ATT, și situsul de inserție al ADN străin în gena poliedrinei la poziția +35 (fig. 45).

Designul unor noi vectori baculovirali a fost astfel conceput încât să poată exprima genele mamaliene corespunzătoare β 1,4-glicoziltransferazei, dar și α 2,6-sialiltransferazei chiar în primele momente ale infecției, asigurând sializarea – adică prelucrarea posttranslațională a proteinelor exprimate în celulele de insecte SF9 (Jarvis și colab., 2001).

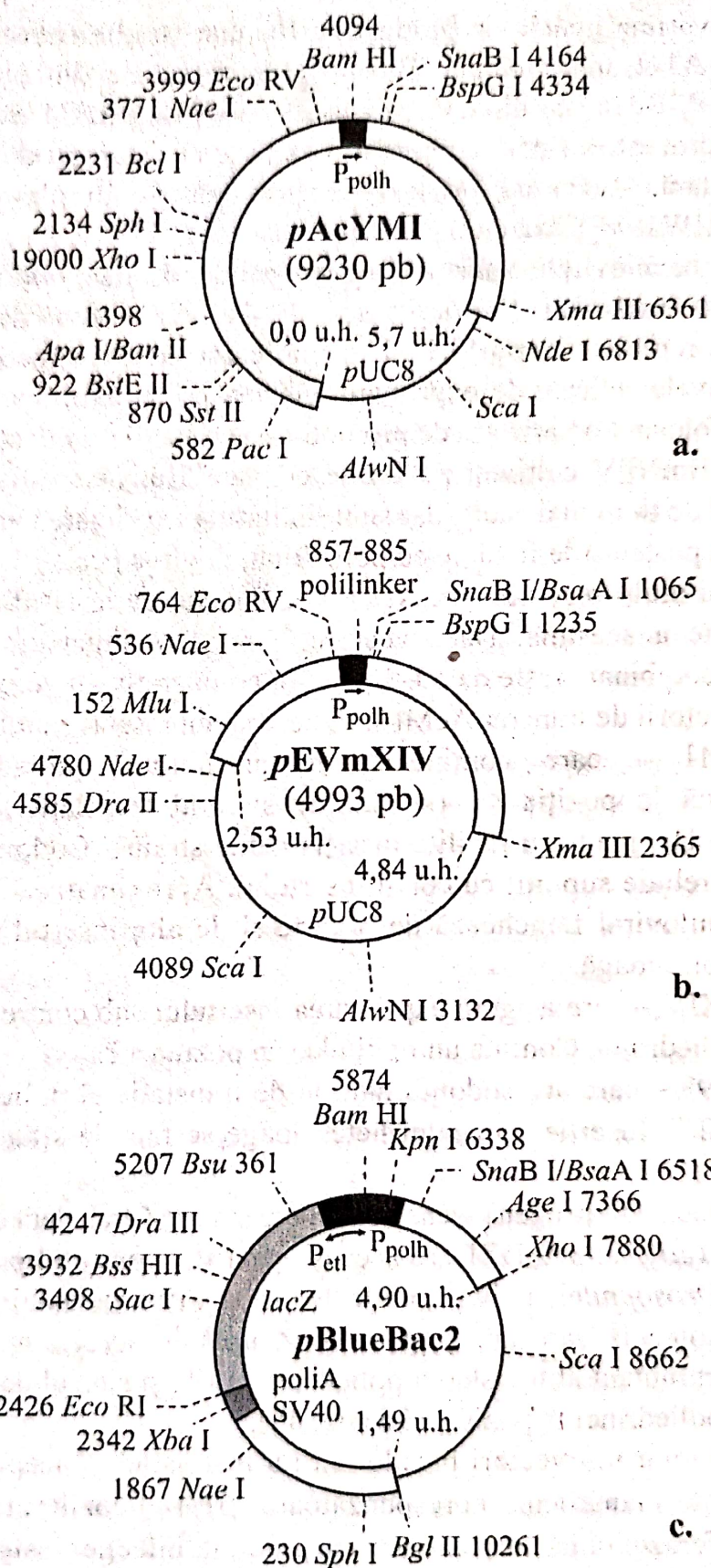


Fig. 45 – Vectori derivați de la baculovirusuri.

4.3.11. VECTORI DERIVAȚI DE LA CAULIMOVIRUSURI

Există două grupe de virusuri ale plantelor care au genom ADN: caulimovirusurile (cu ADN dublu catenar) și geminivirusurile (cu ADN monocatenar). Deoarece tehnologia manipulării genelor implică îndeosebi ADN dublu catenar, caulimovirusurile prezintă interes pentru obținerea de vectori derivați.

4.3.11.1. Biologia moleculară a caulimovirusurilor. Virusurile din această familie, între care se numără CaMV (virusul mozaicului conopidei – *Cauliflower mosaic virus*), DaMV (virusul mozaicului daliei – *Dahlia mosaic virus*), CERV (virusul colorării inelare a garoafei – *carnation etching ring virus*) etc., prezintă dimensiuni și proprietăți serologice similare. Spectrul lor de gazdă este restricționat la câteva plante înrudite. În pofida afinităților serologice, aceste virusuri par a infecta numai gazda specifică. CaMV, spre exemplu, infectează în natură numai membrii familiei *Cruciferae*, deși este transmisibil experimental și la alte plante. Cele mai multe izolate de caulimovirusuri sunt vehiculate de afide (de o manieră non-persistentă), reclamând prezența unui factor de transmitere (nu face parte din particula virală, dar trebuie sintetizat ca răspuns) în celulele infectate.

CaMV este considerat cel mai reprezentativ caulimovirus și ca atare a fost cel mai studiat. Particulele sale izometrice au aproximativ 50 nm diametru și din cele patru polipeptide structurale numai două sunt importante. Genomul încapsidat este o moleculă ADN 8 kpb, dublu catenar circular, dar nu închis covalent. Discontinuitățile din duplexul ADN circular (două creștături pe o catenă și una pe cealaltă) nu sunt „pauze”, ci capetele 3' și 5' întrerupte și suprapuse pe o distanță de 8–20 nucleotide. O altă particularitate a genomului viral o constituie prezența unor oligoribonucleotide scurte, cu posibil rol de *primer*. Secvențierea genomului a dus la identificarea a șase ORF, prezente pe aceeași catenă. Cele mai importante sunt: ORF2 – care codifică factorul de transmitere prin afide, ORF3 – cu rol în infectivitatea virală, ORF4 – pentru proteina de capsidă, ORF5 – al cărui produs prezintă omologie de secvență cu RTaza virusului hepatitei B și produsul genei *pol* din retrovirusuri. Modelul propus pentru replicarea virală presupune conversia ADN dublu catenar circular deschis în forma covalentă închisă, urmată de transcrierea acestuia de către ARN polimerază într-o moleculă ARN(+) mai mare ca genomul, care se reverstranscrie în ADN dublu catenar în conformație de cerc deschis (CD, *open circle OC*), cu terminarea ciclului de replicare.

4.3.11.2. Strategii de obținere de vectori din caulimovirusuri. Multe din dificultățile întâmpinate în manipularea genomului CaMV pot fi explicate prin modul de replicare a acestui virus. Deoarece CaMV se replică asemănător unui element extracromozomal, este necesară conservarea anumitor funcții replicative (reverstranscrierea, semnalele de start și stop) sau a celor asociate acestora (sinteza corpurilor de incluzie virali, proteina de înveliș). Datorită predilecției lor pentru recombinări intra- și intermoleculare, genoamele CaMV modificate pot fi salvate într-un mod care obstrucționează acest potențial. Folosirea ADN viral ca vector de

exprimare se bazează pe deletarea ORF2 cu inserția ADN heterolog la acest situs. Insertul nu trebuie să depășească însă 259 pb.

Avantajele utilizării vectorilor derivați de la CaMV constau în obținerea unui număr mare de copii virale, deci a unei cantități mari de proteină codificată de insert, precum și în posibilitatea transferului eficient de gene bacteriene la plante.

Pe de altă parte, acești vectori prezintă și o serie de dezavantaje, dintre care se pot enumera restricția spectrului de gazdă la familia *Cruciferae*, riscul recombinărilor spontane, dimensiunea mică a insertului (maxim 800 pb dacă de deletează și ORF3), ca și distanța intergenică mică ce poate împiedica exprimarea insertului. Prezența unui număr mare de situsuri de restricție pentru enzimele utilizate în mod curent limitează posibilitățile de clonare.

4.4. VECTORI DERIVAȚI DE LA DROJDII

Saccharomyces cerevisiae constituie un model pentru studii biochimice și genetice, întrucât prezintă o serie de avantaje privind exprimarea genelor eucariote. Studiile de genetică a *S. cerevisiae* sunt mai avansate decât pentru oricare alt eucariot, astfel încât genomul său poate fi manipulat la fel de ușor și rapid ca și cel al *E. coli*. Interesul pentru sistemul de clonare în drojdii este justificat din mai multe motive:

- genomul este de tip eucariot, relativ simplu (de circa patru ori mai mare decât al *E. coli*);
- oferă posibilitatea studierii organizării și exprimării genelor eucariote, inclusiv a prelucrării transcripților;
- prezintă relativă ușurință de cultivare, iar generațiile au durată mică;
- transformarea celulară este simplă, prin comparație cu alte sisteme, dar și pentru că, fiind organisme eucariote (inferioare), drojdiile asigură un mediu propice pentru *folding*-ul heteroproteinelor și pot fi mai ușor utilizate pentru secreția acestora. În plus, deseori, proteinele eucariote sintetizate în *E. coli* sunt insolubile, dar sunt solubile și biologic active sintetizate în drojdii sau în alte eucariote, iar degradarea proteolitică este mai redusă decât la bacterii. Modificările posttranslaționale care nu sunt posibile în bacterii (glicozilarea, fosforilarea, acetilarea) au loc în *S. cerevisiae*. Fiind ușor manipulabile, drojdiile constituie un bun sistem eucariot pentru studii de mutagenază direcționată (*site directed mutagenesis*), unde este necesară exprimarea rapidă pentru analiza mai multor variante ale unei gene.

4.4.1.1. Biologia moleculară a drojdiilor. Drojdiile sunt eucariote adevărate, al căror material genetic – aflat în interiorul nucleului – este împachetat în cromozomi, învelit în propria membrană și partiționat în cursul diviziunii celulare prin mitoză și meioză. Cercetările efectuate pentru descifrarea hărții genetice a drojdiilor au arătat locația a peste 400 de gene, situate pe 17 cromozomi. Anumite gene au putut fi exprimate în *E. coli* (Struhl și colab., 1976), demonstrându-se că ADN de drojdie poartă informația pentru enzime specifice, absente în bacterii.

În celulele de *S. cerevisiae* au fost puse în evidență trei tipuri de elemente extracromozomale, pentru obținerea de vectori epizomali fiind utilizată numai așa numita plasmidă de 2μ ; este vorba de un ADN circular cu diametrul de 2μ , evidențiat prin microscopie electronică și căruia i s-a dat – în mod impropriu, dar încetățenit ca atare – denumirea de plasmidă, deoarece se replică autonom.

Plasmida naturală 2μ are o structură nucleozomică, prezentând gene comune cu ale cromozomului, care îi asigură autonomia. Secvența nucleotidică a acestei plasmide a fost descifrată în 1982, cu determinarea genelor corespunzătoare, care au primit denumirea de Charlie, Baker și Able, fiecare reprezentând câte un ORF. În plasmidă există două regiuni desemnate ca IR1 și IR2 (*inverted repeats*), la nivelul cărora se află originea de replicare (circa 60 pb). Plasmida 2μ nu are o funcție cunoscută, dar se știe că este prezentă în cele mai multe tulpini de drojdie. Primii vectori construiți pe baza acesteia au conținut secvența integrală, prezentând o frecvență mare de transformare și nivele rezonabile de stabilitate. Prezența unui număr limitat de situsuri de restricție a dus la obținerea altor construcții, care conțin numai anumite segmente ale plasmidei 2μ , dar care – deși ușor de manipulat în experimentele de clonare – pierd din stabilitate, îndeosebi în gazdele *cir*⁰ (tulpini care nu conțin plasmida 2μ), în mod particular accesibile acestei plasmide, deoarece nu există competiție. ADN plasmidial 2μ se poate prezenta în două conformații (23A și 14B), care diferă între ele prin poziția *ori* în IR1, respectiv în IR2 (fig. 46).

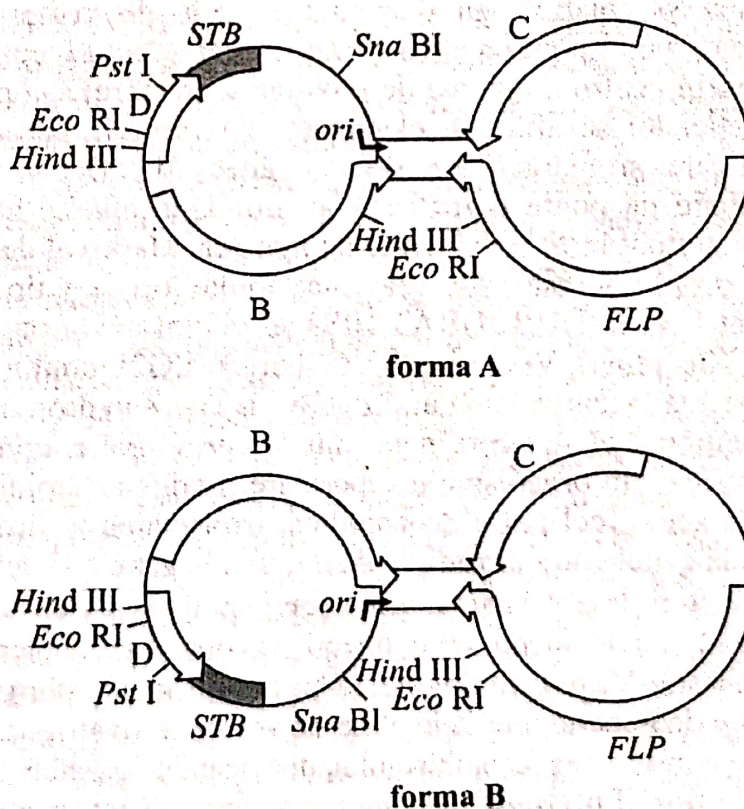


Fig. 46 – Conformațiile plasmidei 2μ .

Pentru o menținere stabilă, plasmida utilizează două mecanisme:

- unul bazat pe amplificare, pentru corectarea numărului fluctuant de copii, ca urmare a unei segregări ineficiente (dependent de produsul genei FLP, recombinază situs-specifică ce catalizează inversia a două unități repetitive; determină cele două conformații plasmidiale, menționate mai sus).

- un altul, pentru reducerea influenței materne în procesul de partiție a plasmidelor, cu creșterea eficienței de segregare pe parcursul înmuguririi (dependent de prezența locusului STB în *cis* și a produșilor genici REP1 și REP2 în *trans*).

Un potențial obstacol pentru pătrunderea ADN străin îl constituie peretele celular subțire al celulelor de drojdie. Prin îndepărtarea acestei structuri, Hinnen și colab. (1978) au obținut sferoplaste, metoda bazându-se pe utilizarea agenților reducători (2-mercaptoetanol) și a preparatelor enzimatică cu activitate glucanazică (zimolast, novozim 234 din *Actinomycete* etc.). Tratate în mod adecvat, sferoplastele au devenit susceptibile interacției cu ADN străin.

Pentru a permite celulei transformate să se dividă, peretele celular trebuie refăcut prin includere în agar stabilizat osmotic, cu mediu selectiv pentru creșterea transformanților. Metodele recente de transformare ocolesc etapa obținerii sferoplastelor, apelând doar la incubarea celulelor cu săruri de litiu și cu ADN heterolog, urmată de precipitarea cu PEG. Dezavantajul constă în scăderea de 10–100 de ori a frecvenței de transformare.

4.4.1.2. Strategii de obținere a vectorilor din drojdii. De la experimentele inițiate de Hinnen și colab., s-au dezvoltat o serie de vectori cu proprietăți particulare, utilizați pentru propagarea ADN clonat (vectori epizomali), pentru exprimare (îndeosebi pentru obținerea de proteine secretoare) sau pentru integrare. La baza construcției lor se află atât elemente de la drojdii, cât și de la bacterii (origine de replicare și markeri de selecție adecvați). Deoarece amplificarea plasmidelor rezultate nu poate fi realizată în drojdii la nivelul atins în bacterie, constructul este menținut în *E. coli* înainte de transfer. Markerul de selecție utilizat pentru sistemul drojdiilor este, de cele mai multe ori, de tip nutrițional (se utilizează frecvent LEU2, TRP1, URA3 HIS3 în tulpini auxotrofe pentru leucină, triptofan, uracil și histidină). Vectorii *pWYG71* și *pWYG2L* conțin gena *Tn909kan* care conferă rezistență la kanamicină în *E. coli* ori la G418 în drojdii.

Trebuie menționat că anumite gene din *S. cerevisiae* conțin introni; totuși, *splicingul* mesagerilor din organisme superioare produs în drojdii este ineficient și/sau aberant. De aceea, cel puțin deocamdată, exprimarea în drojdii, ca și în *E. coli*, este limitată la genele fără introni, la ADNc sau la genele sintetizate chimic.

Folosiți ca vectori de exprimare, vectorii derivați de la plasmida 2 μ sunt de tip suveică, în copii multiple (*multicopy*) sau, uneori, în copii puțin numeroase (*low-copy*), fie epizomali (replicativ YRp; centromeric YCp; bazați pe 2 μ YE_p), fie de integrare (Yip). Factorul care deosebește diferitele clase de vectori derivați este metoda utilizată pentru replicarea și transmiterea recombinatului, distingându-se astfel:

- vectorii de tip YE_p (*yeast episomal plasmids*). Sunt capabili de replicare autonomă, fără integrare. Cei mai mulți vectori de exprimare de acest tip se

bazează pe plasmida 2 μ (6,3 kpb), prezentă în mod natural în cele mai multe tulpini de *S. cerevisiae* (circa 100 de copii/celulă).

Cei mai simpli vectori 2 μ conțin ORI-STB (de exemplu, YEp13 și pWYG4) și sunt utilizați în tulpini gazdă 2 μ^+ care suplinesc proteinele REP1 și REP2. Vectorii STB sunt ușor de manipulat datorită dimensiunilor mici și stabilității superioare față de vectorii ARS. În celule 2 μ -free (2 μ^0) aceste plasmide se comportă ca vectori ARS (*autonomous replicating sequences*). Vectorii ORI-STB utilizați în mod curent, conțin un fragment *Eco* RI de 2,2 kpb sau unul *Hind* III de 2,1 kpb a formei B a plasmidei de 2 μ , fiecare având și o unitate repetitivă inversă. Trebuie menționat că vectorii suveică cu astfel de unități vor exista ca o varietate de recombinanți cu plasmida nativă 2 μ . Vectorii complecși bazați pe plasmida 2 μ conțin genele REP1 și REP2 în plus față de ORI-STB și pot fi utilizați în tulpini 2 μ^0 . Fiind mai mari, sunt mai dificil de manipulat, dar mai stabili;

– vectorii YRp (*yeast replicating plasmids*). S-a descoperit că anumite segmente cromozomale de drojdie au capacitatea de a suporta replicarea autonomă a plasmidelor (ARS). Aceste secvențe ARS au fost izolate din diferite regiuni ale genomului de drojdie, dar și din alte organisme eucariote. S-a postulat – fără a se dovedi – că ARS este o origine de replicare cromozomală. Deși permit o frecvență mare de transformare, vectorii bazați pe aceste elemente sunt foarte instabili odată intrați în celulă. În condiții neselective, sunt pierduți rapid din populație și, chiar sub presiune selectivă, vor fi menținuți numai de o minoritate celulară, incapabilă de segregare în cursul diviziunii, copiile rămânând în celula-mamă.

Vectorii ARS (YRp) sunt prezenți în 1–20 de copii/celulă, sunt instabili mitotic, dar pot fi stabiliizați prin adăugarea secvenței centromerice de drojdie (CEN), însă numărul de copii este redus la 1–2/celulă. În practică, vectorii ARS sunt rar utilizați pentru exprimarea genelor străine;

– vectorii YCp (*yeast centromeric plasmids*). Clarke și Carbon au constatat că adăugarea unor secvențe cromozomale care să includă în construct centromerele duce la creșterea semnificativă a stabilității plasmidelor bazate pe ARS (probabil datorită faptului că permit atașarea la fusul mitotic și meiotic și, deci, la aparatul normal de segregare). Aceste plasmide, prezente în număr de o copie/celulă, sunt utile în situațiile în care are loc clonarea unei gene al cărei produs de exprimare în exces este letal; vectorii ARS/CEN (pBM150) sunt convenabili pentru exprimarea la nivel scăzut;

– vectorii de tip YIp (*yeast integrating plasmids*). Descrierea acestora ca „plasmide din drojdie” este incorectă, deoarece ei nu sunt capabili de replicare intracelulară, fără integrare în cromozom. YIp conțin ADN cromozomal de drojdie pentru țintirea integrării, un marker de selecție și un replicon bacterian, iar integrarea apare ca rezultat al procesului de *crossing over* între segmentul de drojdie din plasmidă și regiunea omologă a cromozomului, alternativă de menținere stabilă a insertului față de forma epizomală.

Spre exemplu, plasmidele LEU2 se vor integra în regiunea cromozomală *leu2*, iar produsul rezultat va fi un cromozom de drojdie cu o plasmidă bacteriană, flancată de duplicația genei *leu2*. Materialul genetic suplimentar este transmis relativ stabil, deși duplicațiile pe segmentul cromozomal din drojdie permit

evenimente de excizie. Cazul reprezintă o înlocuire a alelelor cromozomale cu altele străine și constituie baza unor manipulări la nivel genetic (fig. 47).

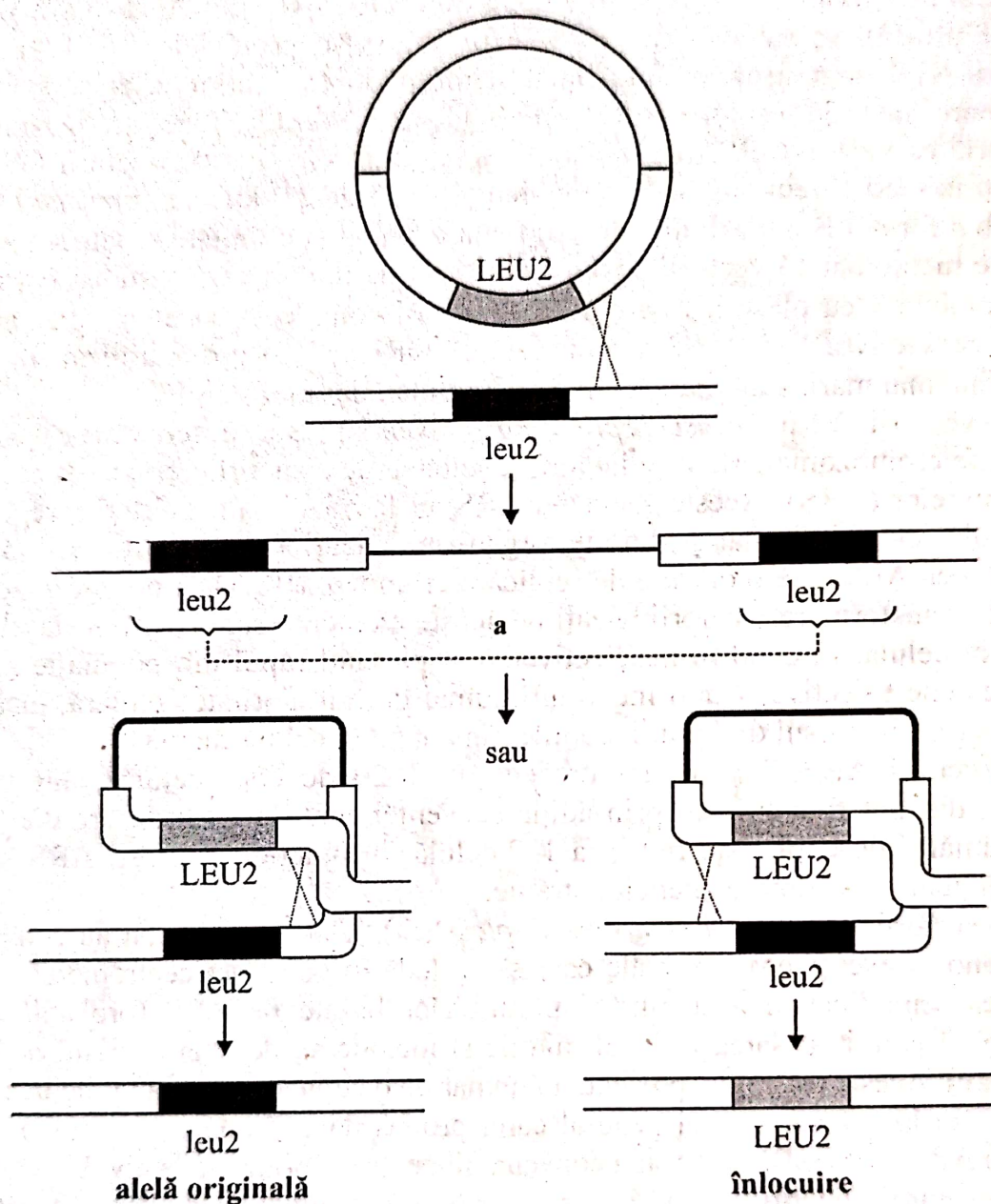


Fig. 47 – Vectori de integrare derivați de la drojdii.

– vectorii YLp (*yeast linear plasmids*). Deși plasmidele centromerice ARS au fost denumite minicromozomi, ele diferă de cromozomii adevărați, având conformația circulară. Adăugarea unor secvențe telomerice la capetele unor plasmide liniarizate de tip ARS duce la obținerea unor vectori liniari, utilizați mai ales în studii asupra structurii cromozomilor. Plasmidele de acest tip sunt mai stabile, în funcție de dimensiunea insertului (până la 50 kpb). Plasmidele liniare nu se replică în *E. coli* și, din punct de vedere tehnic, sunt mai greu de manipulat, în schimb fac posibilă inserarea unor seturi complete de gene în cromozomi eucarioti artificiali.

Sistemul de secreție al *S. cerevisiae* conferă o serie de avantaje; printre care posibilitatea de a obține proteine naturale în conformația corectă (deoarece numai calea secretorie asigură împachetarea potrivită), obținerea cu randamente mari și purificare minimă din mediul de cultură sau chiar secreția de proteine toxice sau instabile în citoplasmă. Dar, atât timp cât N-glucidele și O-glucidele din drojdii diferă de cele mamaliene, secreția de glicoproteine devine problematică. Întrucât glicoproteinele din drojdii sunt antigenice, producția glicoproteinelor mamaliene în acest sistem nu este recomandabilă, deși a fost folosit pentru obținerea de interferon (Hitzeman și colab).

O cerință pentru secreția celor mai multe proteine este prezența unei secvențe polipeptidice semnal, N-hidrofobe (circa 20 aminoacizi), eliberată pe cale secretorie, prezentă în vector; în general, se utilizează factorul feromonic α , invertaza sau fosfataza acidă, codificate respectiv de genele MF α 1, SUC2 și PH05. În aceste condiții, vectorii de secreție exprimă proteine de fuziune conținând o peptidă semnal specifică de drojdie, legată de proteina străină lipsită de semnal. Designul fuziunii trebuie să permită procesarea eficientă a preproteinei himerice, astfel încât să se secrete o proteină matură, cu capăt N-terminal corect. Dintre vectorii de secreție pot fi amintiți pWYG sau SUC (fig. 48).

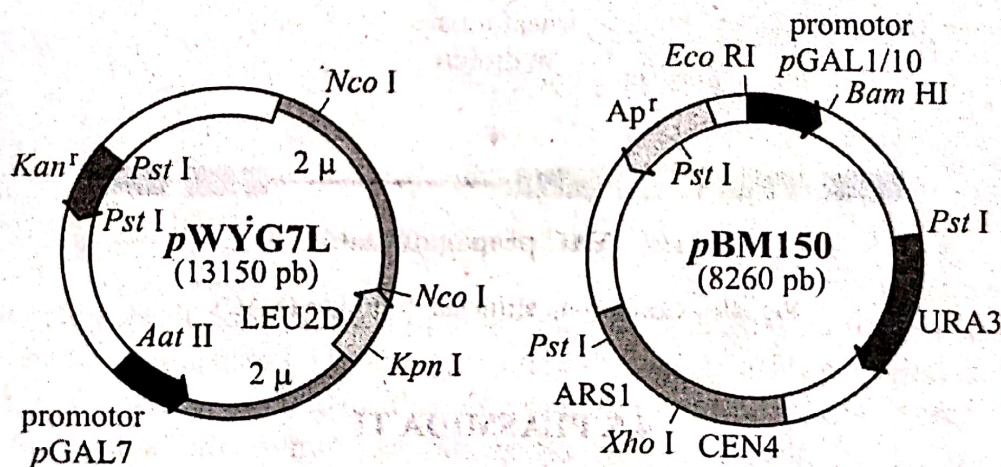


Fig. 48 – Vectori derivați de la drojdii.

4.4.1.3. Sistemul de cromozomi artificiali. Deoarece vectorii derivați de la bacteriofagul λ sau cosmidele au o capacitate relativ limitată de acceptare a informației străine, iar cercetările recente – îndeosebi proiectul de cartare a genomului uman – reclamă vectori cu potențial ridicat de clonare, s-au pus bazele unui sistem axat pe cromozomii artificiali de drojdie (*yeast artificial chromosomes*, YAC). Principiul de utilizare a YAC este similar cu cel al metodelor convenționale de clonare, insertul ADN fiind ligat la două „brațe” ale vectorului, iar amestecul fiind introdus în drojdie prin transformare. Fiecare braț al YAC are un marker de selecție și o secvență ADN orientată adecvat, care funcționează ca telomer. Numai pe unul din brațe se găsesc două secvențe deoxiribonucleotidice scurte, cu rol de

centromer și origine de replicare (denumite elemente ARS). Vectorii YAC permit identificarea rapidă a transformanților, insertul întrerupând o genă supresor ARNt și determinând apariția coloniilor roșii, nu albe ca pentru tulpina sălbatică, purtătoare a genei *amber ade2* (fig. 49).

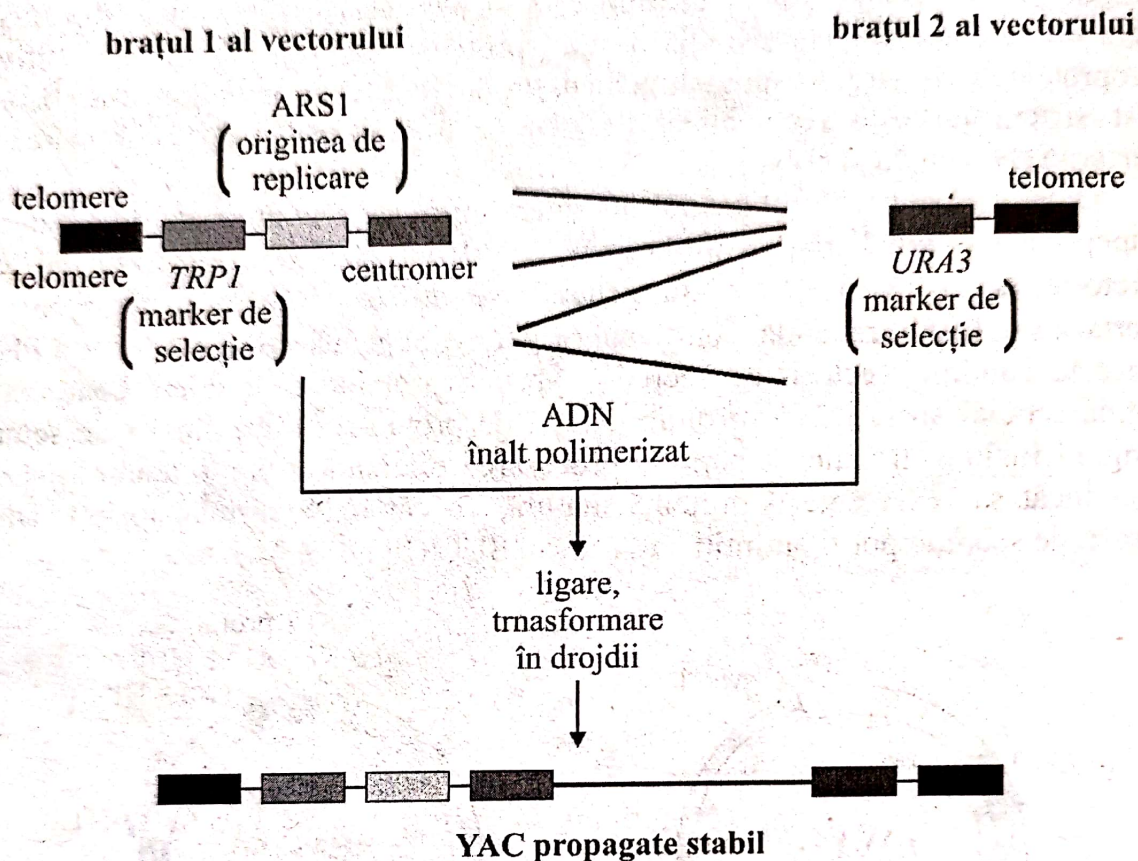


Fig. 49 – Cromozomi artificiali de drojdie (YAC).

4.5. PLASMIDA TI

Celulele plantelor prezintă un perete celulozic, prohibitiv pentru transformarea lor directă, care poate fi îndepărtat prin tratamente enzimice, obținându-se protoplaști, în care poate fi introdus ADN străin, prin diverse metode (fuziune, PEG, lipozomi, microinjecție). Prin regenerarea protoplaștilor transformați se obține planta modificată. Din păcate, metoda poate fi aplicată – deocamdată – doar pentru tutun, morcov, petunie. O altă metodă de transformare celulară se bazează pe agenții patogeni vegetali. În acest sens, s-au utilizat caulimovirusurile, precum și o bacterie din sol *Agrobacterium tumefaciens*. Ca și tehnica de regenerare a protoplaștilor, aceste metode sunt limitate la anumite specii de plante (dicotiledonate) și eficacitatea lor poate fi afectată de absența unui marker ideal de transformare.

4.5.1.1. Biologia moleculară a plasmidei Ti. La ora actuală, vectorul vegetal cel mai promițător pare a fi așa numitul factor TIP (*tumor inducible principle*) sau plasmida Ti (de masă moleculară mare 120 MDa), din *A. tumefaciens*, o bacterie Gram-negativă, originară din sol, cu un larg spectru de gazdă. Plasmida provoacă tumoarea numită *crown-gall*. O dată indusă formarea tumorii, bacteria nu mai este necesară pentru proliferare, deoarece Ti a fost transferat de la bacterie la plantă și aproximativ 1/10 din ea se integrează în ADN nuclear al organismului transformat. Fragmentul integrat este cunoscut ca ADN-T. Tumorile vegetale determinate de *A. tumefaciens* sintetizează o varietate de aminoacizi neobișnuiți, denumiți *opine* (fig. 50).

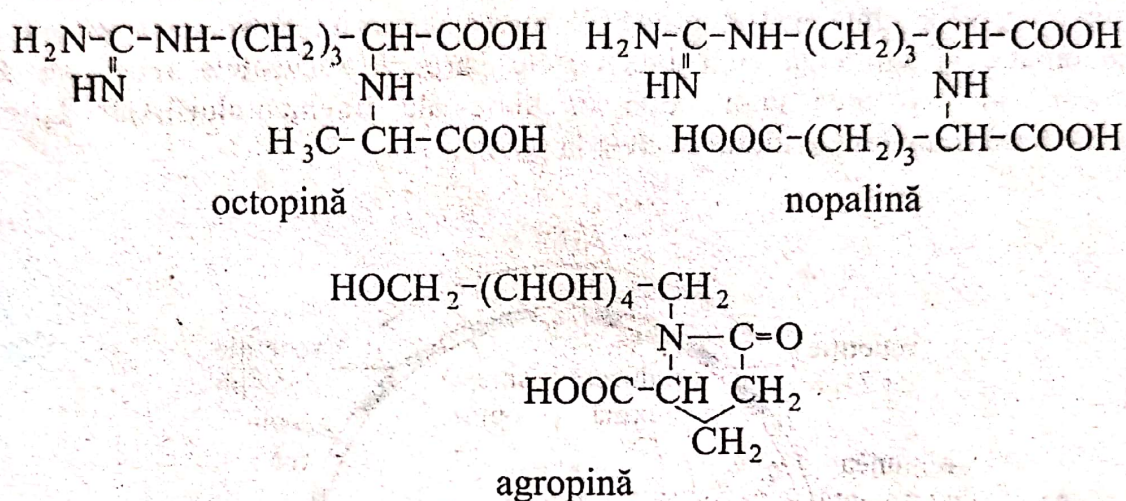


Fig. 50 – Structura chimică a opinelor.

Genele care codifică sinteza opinelor se află în ADN-T și nu sunt exprimate de către bacterie. Plasmida Ti permite bacteriei gazdă să utilizeze opinele ca surse de energie, de carbon și de azot. Prezența opinelor conferă speciei *Agrobacterium* un avantaj legat de infectivitatea sa, față de alte bacterii din sol.

Plasmidele Ti prezente în tuplinile sălbatice sunt clasificate în trei grupe:

- cele care codifică sinteza de octopină N- α -(D-1-carboxietil-L-arginină);
- cele care codifică sinteza de nopalină N- α -(1,3-dicarboxipropil-L-arginină);
- cele care codifică sinteza de agropină (produs de condensare al lactamei acidului glutamic cu hexitolul).

Reprezentanții primului grup prezintă un grad mare de omologie, în schimb cei din al doilea grup sunt eterogeni. Între cele două grupe există un anumit grad de similitudine, restrâns la patru zone, corespunzătoare secvențelor ADN cu funcții asemănătoare. Secvențializarea a făcut posibilă localizarea unor funcții pe harta plasmidei Ti, cum ar fi: oncogenitatea, sinteza de opine, catabolismul opinelor, transferul conjugativ al plasmidei, regiunea virulenței, regiunea implicată în replicare (fig. 51).

În afara ADN-T, în oncogenitate este implicată regiunea de virulență, neintegrată în genomul vegetal. Producții regiunii de virulență se exprimă numai după inducerea lor de către anumiți factori vegetali și participă, probabil, în transferul și integrarea ADN-T. Mecanismul de transfer al ADN-T nu este cunoscut, bacteria însăși nereușind să intre în celula vegetală. Este de presupus că întreaga plasmidă Ti sau numai fragmentul ADN-T străbate peretele bacterian și apoi pe cel celular. Identificarea ADN-T în diferite locații a dus la concluzia că nu există secvențe ADN celulare specifice, care să servească drept situsuri de inserție. Cercetările au evidențiat o secvență repetitivă de 25 pb, care flanchează marginile ADN-T, secvență cu funcție *cis*-activatoare asupra acestui fragment. Dacă îndepărtarea regiunilor repetitive din amonte nu afectează transferul ADN-T, eliminarea celor din aval suprimă formarea tumorii, chiar dacă genele de oncogenitate și virulență sunt intacte. Se pare că secvențele repetitive sunt implicate în inducerea unor copii circulare ale fragmentului ADN-T, care intermediază transferul acidului nucleic la plante.

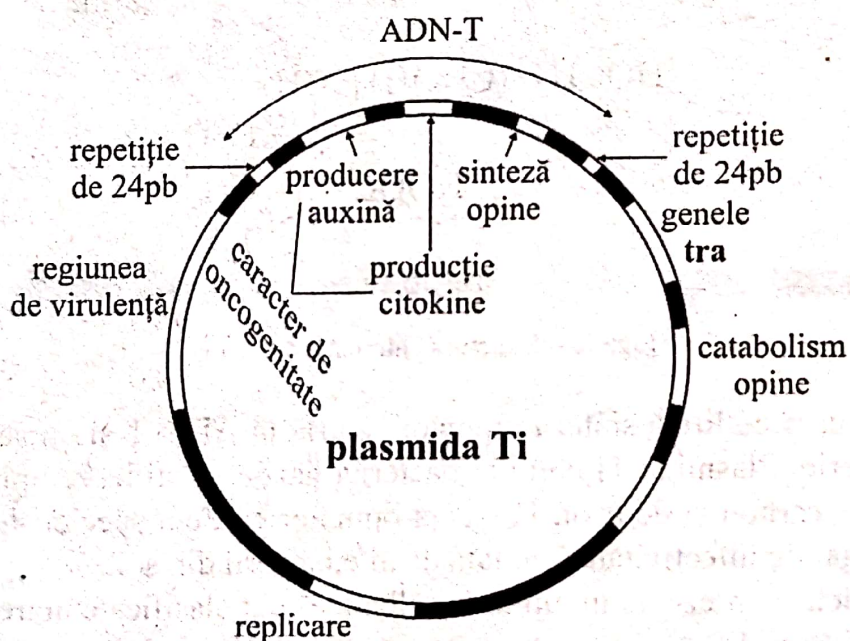


Fig. 51 – Harta plasmidei Ti.

4.5.1.2. Strategia obținerii vectorilor derivați de la plasmida Ti.

Problemele de care s-au izbit cercetătorii când au vrut să utilizeze plasmida Ti ca vector au fost legate de dimensiunea acesteia, de imposibilitatea identificării situsurilor de restricție ale regiunii T, precum și de existența unor promotori care să asigure exprimarea insertului. Pentru depășirea acestora, s-a obținut un „vector intermediar”: un subfragment ADN-T a fost clonat într-un vector deja cunoscut (*pBR322*). Fragmentul este inginerizat astfel încât să conțină secvențele repetitive de 25 pb, o genă marker sub controlul unui promotor funcțional și unul sau mai multe situsuri de restricție. Dacă insertul nu este de origine vegetală, situsurile de

restricție trebuie precedate de promotori funcționali. „Vectorul intermediar” este introdus în tulpini bacteriene adecvate, care conțin plasmida Ti inginerizată astfel încât una din cele două gene care codifică hormoni vegetali să fie deletată, dar regiunea de virulență și cele două secvențe repetitive să rămână intacte. Recombinarea *in vivo* între „vectorul intermediar” și noua plasmidă Ti asigură schimbul de gene, cu includerea insertului în regiunea ADN-T echivalentă. Producția de hormoni vegetali din plasmida inginerizată poate fi utilizată ca marker de selecție pentru testarea celulelor transformate, atâta vreme cât nu există nici o genă de rezistență la antibiotice.

Pentru ca plantele să recunoască secvențele promotor ale insertilor și să respecte semnalele de „start” și „stop” s-au obținut construcții bazate pe introducerea promotorului *nos* (nopalinsintaza) în amonte de gena insert. Trebuie menționat că cele mai bune rezultate în transferul de informație s-au obținut în celulele de tutun și petunie.

PASAGERUL

În cadrul tehnologiei ADN recombinat vectorul are un rol de prim ordin, dar în absența pasagerului el devine un nonsens, iar calitățile sale – oricât de deosebite ar fi – ar rămâne nevalorificate. Deci, *componenta centrală* a tehnologiei clonării este *secvența pasager*, succesul fiind asigurat de modul în care se realizează multiplicarea și/sau exprimarea sa. De altfel, însăși rațiunea de a fi a acestei tehnologii constă în sinteza conform cerințelor a produsului codificat de pasager. În funcție de tipul de vehicul, pasagerul poate fi introdus în orice tip de celulă; secvențele pasager introduse în vector se comportă pasiv și ajung sub controlul mecanismelor enzimatice de sinteză și reglaj proprii sau ale vehiculului care îl produce și/sau exprimă.

Pasagerul este orice fragment de ADN care conține informația genetică necesară biosintezei unui anumit produs biologic (hormon, enzimă, alte proteine). Experimentele au arătat că ADN recombinat – adică pasagerul legat de vector – nu alterează capacitatea genei respective de a dirija sinteza produsului pentru care deține informația. Deci, odată cu multiplicarea lui în celulă, vectorul asigură și multiplicarea pasagerului.

Pentru a construi o moleculă de ADN recombinat practic nu contează proveniența fragmentului pasager, dar pentru exprimarea mesajului inclus structura și organizarea acestuia are o deosebită importanță. Pasagerul poate fi izolat sau sintetizat pe diferite căi (mecanice, strict biochimice, strict chimice sau combinate), informația lui genetică fiind exprimată în orice tip de celulă, condiția impusă fiind inserarea într-un vector adecvat.

5.1. METODE DE OBTINERE

5.1.1. METODE MECANICE

În vederea obținerii unui segment de ADN de interes, fragmentarea se poate face mecanic sau prin ultrasonicare. Astfel, pentru izolarea genei ARN 5S de drojdie, s-a recurs la separarea ADN cromozomal corespunzător, care apoi a fost

rupt mecanic prin așa-numitul *shearing* (trecerea prin ac de seringă sau prin capilar cu un lumen foarte îngust). Numeroasele fragmente rezultate au fost clonate în plasmide, amplificate, hidrolizate cu *Eco* RI, iar apoi selectate prin hibridizare cu diverse specii de ARNr: 5S, 5,8S, 18S, 28S. În final, a fost ales un fragment de 2 600 pb, care a hibridizat cu sonda corespunzătoare ARNr 5S. Lipsa de reproductibilitate, ruperea având loc în mod aleator, a făcut ca obținerea genelor prin aceste metode să fie înlocuită cu metode mult mai fiabile.

5.1.2. METODE ENZIMATICE

Moleculele de ADN cu rol de pasager pot fi sintetizate *in vitro* cu ajutorul enzimelor, al căror substrat poate fi reprezentat de diferite matrice:

- ARNm corespunzător genei de interes;
- ADN bicatenar: ca atare, crestat (*nicked*), cu goluri (*gapped*).

În toate variantele menționate, sinteza *de novo* se realizează cu ajutorul polimerazelor, în prezența celor patru deoxinucleozidtrifosfați.

5.1.2.1. Hidroliza enzimatică. Metoda cea mai simplă de obținere a pasagerului constă în fragmentarea specifică a unui ADN genomic, urmată de identificarea, separarea și purificarea secvenței de interes. Dar această metodă se poate aplica direct numai dacă genomul poate fi izolat și purificat cu relativă ușurință, dacă se cunoaște total sau măcar parțial harta genetică a organismului respectiv și dacă scindarea genomului (specifică sau aleatorie) nu duce la distrugerea proprietăților biologice ale pasagerului.

Se știe că genele eucariote în general, cele umane în special, au o structură de mare complexitate, iar localizarea lor a fost rareori precizată. În acest moment, ambițiosul proiect „Genomul uman”, care a avut ca obiective descifrarea structurii și amplasării celor circa 30 000 – 50 000 de gene, a reușit localizarea lor pe cromozomii. Totuși, izolarea directă a genelor din genom a fost limitată la un număr relativ restrâns de situații, în cazul unor bacterii cum ar fi *E. coli* sau virusuri (SV40, fagul λ etc.), intens studiate și cu hărțile genetice și nucleotidice deja descifrate.

În ingineria genetică scopul imediat al experimentelor este inserarea unui anumit fragment de ADN cromozomal într-o plasmidă sau într-un vector viral. Pentru aceasta, moleculele de ADN trebuie clivate la locuri specifice, iar apoi fragmentele de interes trebuie izolate.

În general, aceste fragmente rezultă prin hidroliza moleculelor ADN cu enzime specifice, cu o anumită clasă de nucleaze. Din diverse organisme a fost izolată o multitudine de enzime nucleolitice, dar foarte multe dintre acestea taie molecula de ADN în mod nespecific. Există însă și clasa de nucleaze care hidrolizează ADN în mod reproductibil de fiecare dată, deci enzime care taie

specific (endonucleaze de restricție). Enzimele de restricție sunt instrumente de elecție pentru scindarea genomului. Se pot folosi una sau mai multe enzime, care hidrolizează conform situsurilor lor specifice, dar aleatoriu din punct de vedere al structurii genomului. Indiferent de metoda folosită pentru ruperea genomului, fragmentele rezultate sunt separate electroforetic, identificate prin mijloace specifice (de exemplu, prin hibridizare cu sonde moleculare), iar apoi izolate din gel (prin electroeluție etc.), servind în continuare la construirea ADN recombinat.

Pornind de la faptul că anumite secvențe nucleotidice, în anumite condiții, pot fi protejate prin legarea unor proteine specifice, s-au mai propus și alte metode, utilizabile și azi, chiar dacă numai pentru unele studii și nu neapărat pentru izolarea pasagerului. De exemplu, ARN polimeraza se leagă la secvențe promotor din ADN, rezultând un complex care sub acțiunea DNazei I se hidrolizează, cu excepția secvențelor protejate. Segmentele respective au fost purificate prin gel-filtrare și folosite pentru clonare.

Izolarea unor operatori, cum ar fi cel pentru lactoză din genomul fagului λ , s-a făcut pe baza unui principiu analog de către Pirota (1973): ADN λ purificat a fost scindat prin ultrasonicare, obținându-se fragmente cu mase de $3-6 \times 10^5$ Da; acestea au fost tratate cu proteina represor corespunzătoare și trecute pe membrane de nitroceluloză, pe care rămân fixate numai secvențele nucleotidice complexate cu proteina. Apoi, ele au fost eluate prin spălare cu detergenți ionici (tip DDS), care produc disocierea complexului, au fost recomplexate cu proteina, tratate timp scurt la rece cu DNaza I, pentru hidroliza nucleotidelor excedentare, refixate pe nitroceluloză și disociate cu DDS. Secvența operatorului astfel obținută poate fi clonată sau supusă altor studii.

Metodele enzimatică – de tipul celor prezentate mai sus – sunt laborioase, incluzând un număr mare de etape de lucru, care nu se pretează pe de-a întregul la automatizare. În final, se obțin cantități relativ reduse de material de interes. Taierea cu enzime de restricție este de preferat, numai că nu întotdeauna se poate obține gena în totalitate, cu păstrarea tuturor secvențelor necesare pentru funcționarea ei. În acest caz, se poate apela la alte metode.

5.1.2.2. Sinteza enzimatică. Este cea mai uzitată cale de obținere a pasagerului, pornind de la diverse principii, care au la bază proprietățile anumitor enzime (reverstranscriptaza sau ADN polimeraza).

Reverstranscrierea este una dintre metodele de sinteză enzimatică ce exploatează funcția reverstranscriptazică de sinteză a ADN pe matrița ARN. În acest caz, gena insert se află sub forma unui ADN complementar față de ARNm matur, care corespunde exclusiv regiunilor exonice ale genei eucariote native (adică se păstrează în moleculă numai transcriptonii corespunzători exonilor, majoritatea genelor EK fiind „mozaicate”). Sinteza enzimatică a unei gene cu ajutorul acestei metode depinde însă de posibilitatea izolării și purificării ARNm specifici diverselor

gene. În celulele diferențiate, cea mai mare parte a ARNm prezent dirijează sinteza unor proteine specifice. De exemplu, în cazul celulelor B din insulele lui Langerhans, din pancreas, se sintetizează preponderent insulina, ceea ce determină ca din aceste celule să se izoleze ARNm corespunzător. La fel, ARNm al ovalbuminei predomină în oviductul de găină, unde reprezintă circa 50% din ARNm poliA al acestor celule, când sunt stimulate hormonal.

De regulă, purificarea ARNm eucariot se realizează prin cromatografie de afinitate, utilizând poliU-Sepharose sau oligodT-celuloză sau variante îmbunătățite și performante ale acestor produse, cum ar fi bilele magnetice „îmbrăcate” cu oligodT.

Așa după cum s-a arătat la capitolul „Enzime”, reverstranscriptaza are patru activități enzimatică, prezente pe același suport de material proteic; între acestea, pentru tehnologia ADN recombinat prezintă interes activitatea de ADN polimerază-ARN dependentă și cea de RNază H. Schema generală de obținere a pasagerului prin reverstranscriere este redată în fig. 52.

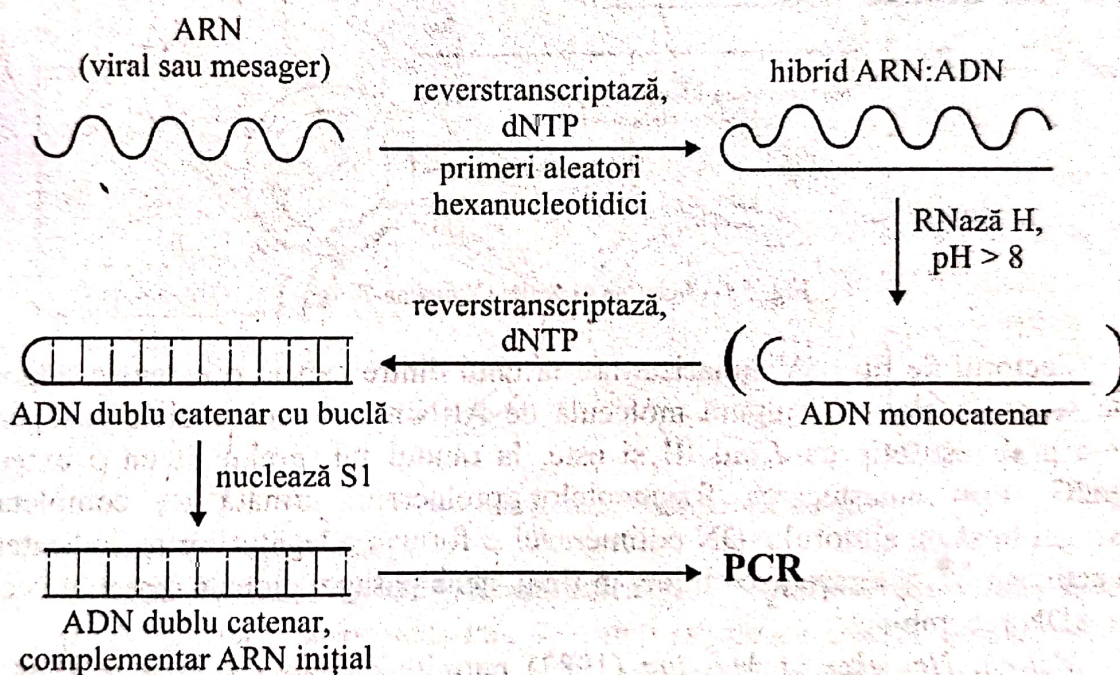


Fig. 52 – Principiul reacției de reverstranscriere.

Pot fi utilizați hexaprimeri aleatori, care generează însă un amestec de ADNc, corespunzător tuturor ARNm transcriși. Specificitatea reacției reverstranscriptazice este condiționată de folosirea unui *primer* corespunzător genei de interes.

Deci metoda permite obținerea unei gene artificiale, diferită de cea naturală. Ea este afectată de discontinuitatea etapelor de lucru. Pentru eliminarea acestor dezavantaje s-au preconizat metode mai eficiente de clonare a ADNc, făcându-se direct sinteza acestuia pe molecula vectorului pregătit în mod special.

Metoda Okayama și Berg (1982) se bazează pe vectorul-suveică *pSV*, derivat de la SV40, vector care prezintă două origini de replicare, una corespunzătoare unui

sistem eucariot și una specifică unui sistem procariot. Principiul utilizării acestei metode este prezentat în fig. 53.

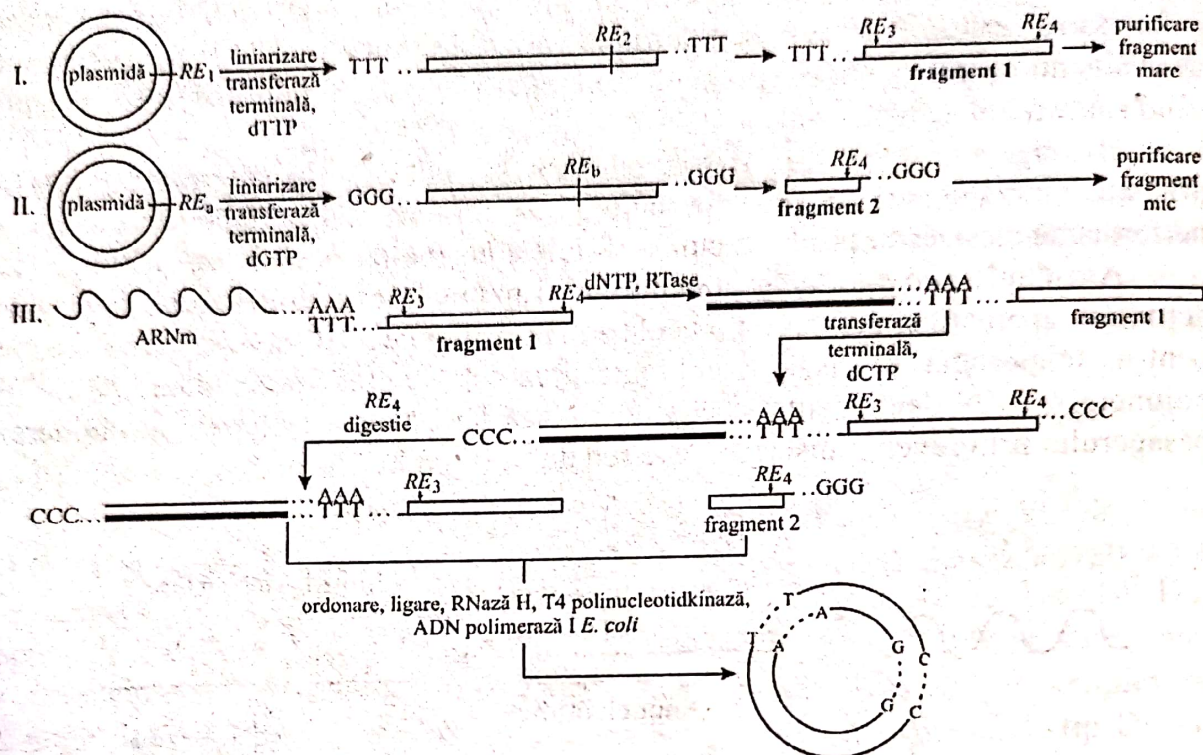


Fig. 53 – Schema metodei Okayama-Berg.

Vectorul de tip *pSV* liniarizat are la unul dintre capete o extensie oligodT, unde se poate clona o singură moleculă de ARNm. Acidul nucleic pasager se obține prin restricție cu *Hind* III și este, la rândul lui, prelungit cu o extensie oligodG. Prin amestecarea fragmentelor prelucrate, urmată de completarea secvenței lipsă cu ajutorul ADN polimerazei și formarea legăturilor fosfodiesterice sub acțiunea ADN ligazei, se obține, în final, gena pasager clonată direct în vector, deci ADN recombinat.

Metoda Heideker si Messing (1983) permite clonarea simplă a ADNc în sistem procariot. Se utilizează un vector derivat din plasmida *pUC19*, cu capete oligodT, introduse după tăierea vectorului cu enzima *Pst* I; rezultă oligodT-*pUC9* care se poate complexa cu două molecule de ARNm poliadenilat. Complexul, pus în contact cu reverstranscriptaza în prezența celor patru dNTP, duce la sinteza ADNc corespunzător. După terminarea sintezei, capetele ADNc se prelungesc cu cozi oligodC, iar produsele obținute se centrifughează în sucroză alcalină (care distruge ARNm la $pH > 7$ și desface punțile de hidrogen); astfel apar patru produși monocatenari, care conțin o catenă din *pUC9* prelungită cu ADNc. Se folosește apoi un al doilea vector și anume *pUC9* cu cozi oligodG, care la rândul lui va fi denaturat alcalin, cu separarea celor două catene. Cele două tipuri de vector se amestecă, moleculele *pUC9*-oligodG se cuplează cu cele *pUC9*-oligodC;

readucerea la pH neutru produce rearanjări, iar hibrizii rezultați se incubează cu ADN polimerază, care repară și completează zonele monocatenare existente. În aceste condiții, apar două specii de hibrizi, cu inserți având diferite orientări ale genei. Se elimină hibridul cu orientarea incorectă, rezultând un recombinat funcțional. Fig. 54 prezintă schema de principiu a metodei.

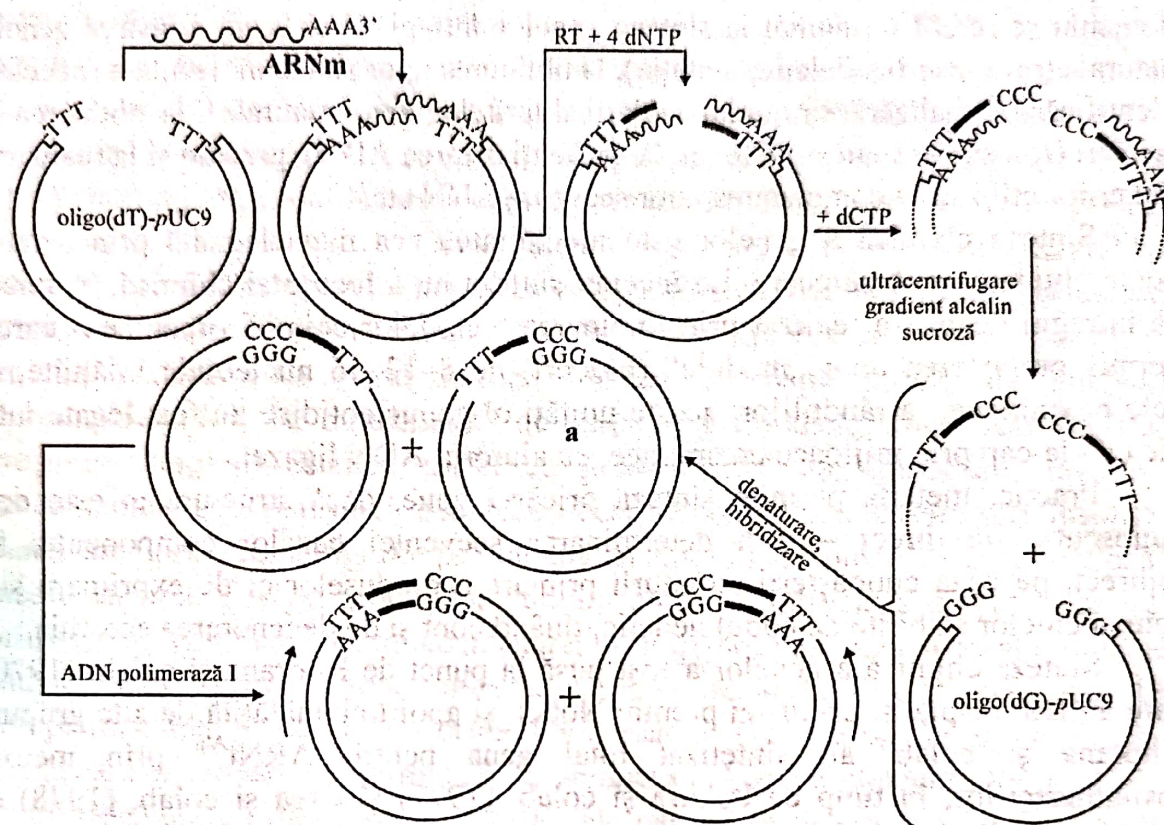


Fig. 54 – Schema metodei Heideker-Messing.

Reacția de amplificare polimerazică (PCR, *polymerase chain reaction*) (v. cap. 6) este una dintre metodele cele mai rapide de sinteză a pasagerului. Se poate recurge la ea cu condiția cunoașterii structurii primare a capetelor genei, pe baza căreia se face designul *primerilor*. Prezintă avantajul că permite inserarea la extremitățile fragmentului sintetizat a unor situsuri specifice pentru anumite enzime de restricție (sau polilinkeri), ceea ce determină ligarea la secvențele vectorului liniarizat cu aceeași/aceleși enzime. Structura primară a genei sintetizată astfel este dependentă de eficiența procesului de *proofreading* a ADN polimerazei termorezistente.

Întrucât de multe ori dimensiunea genelor de sintetizat este foarte mare, se face apel la varianta *long range PCR*, care utilizează un amestec de ADN polimeraze necesare asigurării eficienței și citirii corecte a matricei.

În varianta RT-PCR, se pot obține inserți ADNc, corespunzători ARNm.

5.1.3. METODE CHIMICE

O dată cu apariția tehnologiei ADN recombinat, sinteza moleculelor de ADN a devenit de o importanță capitală, deoarece ea putea furniza gene imposibil de obținut pe alte căi și, eventual, anumite elemente de reglaj genic sau alte componente esențiale, necesare noii tehnologii. Principalele aplicații ale sintezei chimice în acest domeniu se referă nu numai la sinteza genelor întregi, ci și la modificarea genelor naturale (prin inserție, deleție, mutație), la obținerea unor sonde moleculare (necesare identificării, localizării sau chiar izolării diferitelor gene naturale), la obținerea de primeri (folosiți în analiza PCR sau la secvențializarea ADN), precum și la realizarea linkerilor utilizați în completarea unor secvențe ADN etc.

Sinteza chimică a genelor este modalitatea cea mai elegantă prin care se poate obține o genă oarecare. La început sinteza nu a fost total chimică, în sensul că întregul genei s-a realizat prin îmbinarea metodelor chimiei organice – care a permis producerea unor „module” (blocuri) de 8–12–16 nucleotide înălțuite, cu cele biochimice; la rândul lor, aceste unități oligonucleotidice au fost legate între ele cap-la-cap prin mijloace enzimatice, cu ajutorul ADN ligazei.

Practic, metoda permite sinteza oricărei gene, dacă structura ei este deja cunoscută, fie direct – prin determinarea secvenței bazelor componente, fie indirect, pe baza cunoașterii structurii primare a produselor ei de exprimare și a echivalențelor stabilite de codul genetic, ținând cont și de degenerarea acestuia.

Sinteza chimică a genelor a fost pusă la punct de Khorana și colab. (1970), care au fost răsplătiți printr-un premiu Nobel, și apoi îmbunătățită de alte grupuri. Khorana și colab. au sintetizat total gena pentru ARN^t^{Ala} prin metoda fosfatdiesterilor, în timp ce Itakura și colab. (1977) și Crea și colab. (1978) au construit gena pentru somatostatină și, respectiv, pentru insulină, folosind metoda fosfattriestrilor.

În ultimul deceniu, ADN sintetic – folosit ca primer în PCR, în mutageniza țintită (*site-directed mutagenesis*) sau ca sondă în selecția anumitor secvențe – a dobândit o largă utilizare, mai ales datorită dezvoltării unor metode eficiente de sinteză chimică în fază solidă, pe baza metodelor clasice în soluție. Introducerea dispozitivelor automate de sinteză a făcut din obținerea moleculelor de ADN sintetic aproape o lucrare de rutină, dacă se ține cont de puritatea și de calitatea reactivilor și a solventilor implicați.

Metodele de sinteză chimică a oligonucleotidelor se bazează pe două procedee generale, din care în timp au derivat mai multe variante: metoda fosfattriestrilor și metoda fosfittriestrilor; inițial concepute pentru sinteza manuală, ambele – în diverse variante – au fost adaptate ulterior pentru automatizare.

5.1.3.1. Metoda fosfatdiesterilor. La nivelul anului 1965, ARN^t^{Ala} era singurul acid nucleic cu structură primară integral descifrată. Acest fapt a permis

ca pe baza codului genetic să se stabilească structura genei corepunzătoare, construită apoi din „blocuri” oligonucleotidice.

Sinteza a început de la capătul 5'-OH al ADN, iar prima legătură internucleotidică s-a realizat prin condensarea deoxiguanozinei protejate (5' cu monometoxitritil MMTr și 3' cu acetil OAc) cu un adenzin-5'-fosfat protejat corespunzător, în prezența dicitlohexilcarbodiimidei (DCHCDI) ca agent de condensare. La rândul lor, grupările funcționale ale bazelor heterociclice au fost protejate astfel: gruparea -NH₂ de la guanină – cu izobutiril tBu; gruparea -NH₂ de la adenină – cu benzoil Bz; gruparea -NH₂ de la citidină – cu anisoil An. În etapa următoare, s-a procedat la condensarea succesivă între blocuri de di-, tri-, tetra- și pentanucleotide la capătul 3'-OH al catenei crescând de polinucleotid, având toate celelalte grupări funcționale protejate cu agenții specifici de blocare; condensarea unui pentanucleotid cu un trinucleotid dă naștere unui octanucleotid etc. În acest tip de sinteză s-au putut realiza blocuri de până la 20 de nucleotide (icosanucleotide), dar randamentul de obținere a produșilor finali scade odată cu creșterea lungimii catenei, astfel că produșii cei mai importanți rezultă cu randamentele cele mai mici, deoarece fiecare etapă de condensare este însoțită de purificarea prin cromatografie pe coloană cu anioniți (de obicei DEAE-celuloză, în mediu cu uree 7 M) a produșilor obținuți anterior. Întrucât segmentele rezultate prin sinteză chimică sunt monocatenare, se impune realizarea separată a ambelor catene, care prin simplă amestecare dau naștere la ADN_{dc}, cu baze complementare. Ulterior, în urma unor reacții enzimatic de ligare, care se desfășoară în condiții determinate de temperatură și de concentrație a Mg²⁺, se obțin molecule cu dimensiunile dorite, ale căror capete vor fi apoi 5'-fosforilate sub acțiunea polinucleotidkinazei T4.

5.1.3.2. Metoda fosfatriesterilor. Itakura și colab. (1977, 1978) au perfecționat această metodă, reducând substanțial timpul necesar sintezei moleculelor de ADN, utilizând triesterii în locul fosfatdiesterilor (fig. 55).

Ca și pentru metoda fosfatdiesterilor, fundamentală este blocarea selectivă a grupărilor funcționale ale nucleotidelor și lăsarea liberă doar a grupărilor care trebuie să reacționeze la un moment dat. Și în acest caz se merge din aproape în aproape: trimeri-hexameri (pentameri)-dodecanucleotide, în final legarea fragmentelor de dimensiuni convenabile efectuându-se tot cu ADN ligază, deci enzimatic.

În amândouă căile de sinteză, la origine s-a utilizat DCHCDI și o sulfonilclorură, pentru realizarea condensării grupării 5'-OH de la un nucleotid cu gruparea 3'-fosforil (sau 3'-fosforilester) de la următorul nucleotid. Ca intermediari, în reacție se formează pirofosfat, apoi un cation metilimidazoliu deosebit de reactiv, cu reducerea timpilor de cuplare și a posibilelor reacții secundare.

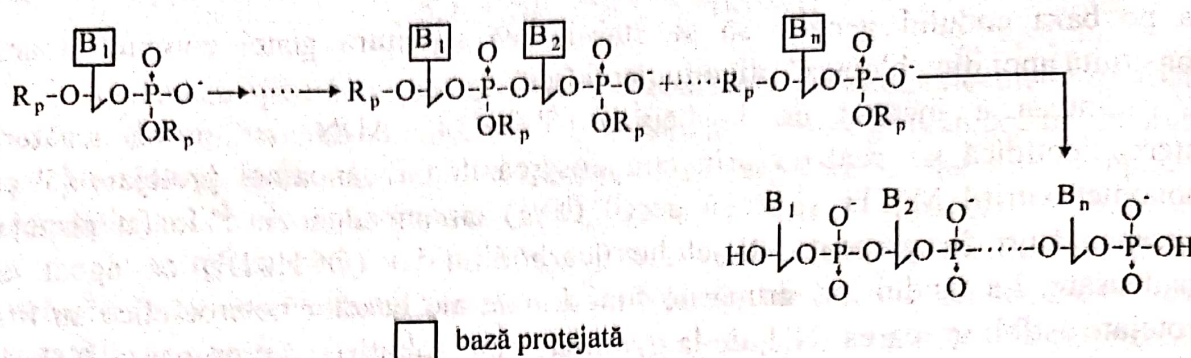


Fig. 55 – Schema sintezei chimice prin metoda triesterilor.

5.1.3.3. Metoda fosfitriesterilor. În cazul metodei fosfitriesterilor, elaborată de către Letsinger și colab. (1982), se lucrează cu derivați ai P^{III} de tipul fosfodiamiditilor ($R_p-O-P(OR_p)(NR_2)_2$), foarte reactivi și care sunt activați în prezența unor acizi

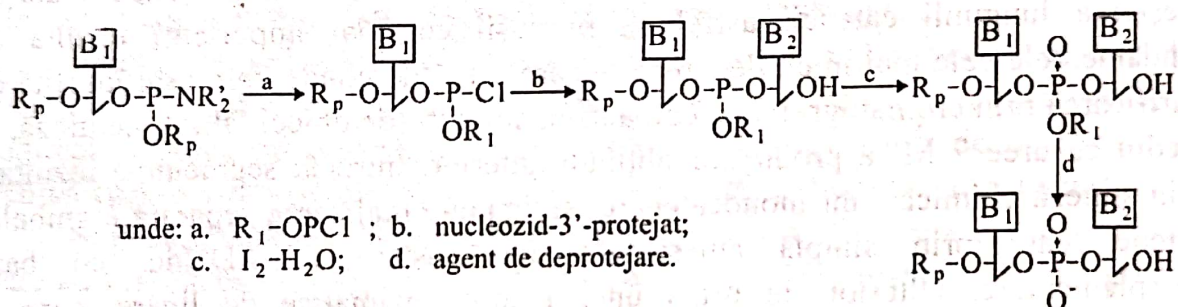


Fig. 56 – Metoda fosfitriesterilor.

Factorul determinant al randamentelor de cuplare este reactivitatea fosfodiamiditului, care se prepară în prealabil și se păstrează ca atare, ca pudră. Întotdeauna se recurge la protecția grupărilor $-NH_2$ exociclice ale A, G, C și a grupărilor $-OH$ ale deoxiribozei.

5.1.3.4. Metoda H-fosfonaților. Froehler și Mateucci (1986) au descris o variantă de sinteză a ADN cu înalte performanțe. Sinteza este avantajată de faptul că implică doar două operațiuni principale: deproteizarea (adică îndepărtarea grupării dimetoxitritil 5'-DMTr) și cuplarea cu nucleotidul 3'-fosforilat. Grupările fosfonate sunt stabile în mediul acid utilizat pentru deproteizare, ceea ce face necesară oxidarea lor o singură dată, simultan pentru toate, la sfârșitul sintezei. Această caracteristică a făcut ca principiul metodei să fi stat la baza construirii unor tipuri de „mașini de gene”, care utilizează reacții în fază lichidă.

La ora actuală, sinteza se efectuează cu sintetizatoare prevăzute cu microprocesoare. Sinteza începe cu capătul 3', prin atașarea unui nucleozid la un suport insolubil. Acesta trebuie să fie compatibil cu reactivii și cu solvenții, să ofere o mare

suprafață utilă pentru derivatizare, nedeformabilă în cursul reacțiilor. Pentru bunele proprietăți de curgere și pentru ridicata eficiență prezentată în cursul sintezei se preferă sticla sinterizată sau bilele de sticlă/de polistiren, cu porozitate controlată. De asemenea, se mai pot folosi materiale compozite, cum ar fi polidimetilacrilamida polimerizată în interiorul unor bile de silicagel (*kieselguhr*), care asigură un grad înalt de încărcare cu reactivi și, ca urmare, sinteza unor cantități mai mari de oligonucleotide. Numeroase sisteme automate utilizează pentru sinteză β -cianoetilfosfoamidiți. Nucleozidul de start poate fi A, G sau C, protejate corespunzător, sau T neprotejată. De asemenea, oricare dintre nucleotide ar fi primul, el are blocată gruparea 5'. În acest caz, se recurge la derivați oligonucleotidici cu un braț lung alchilaminic (*spacer*), având gruparea succinil, pentru înlăturarea eventualelor împiedicări sterice în reacție (fig. 57).

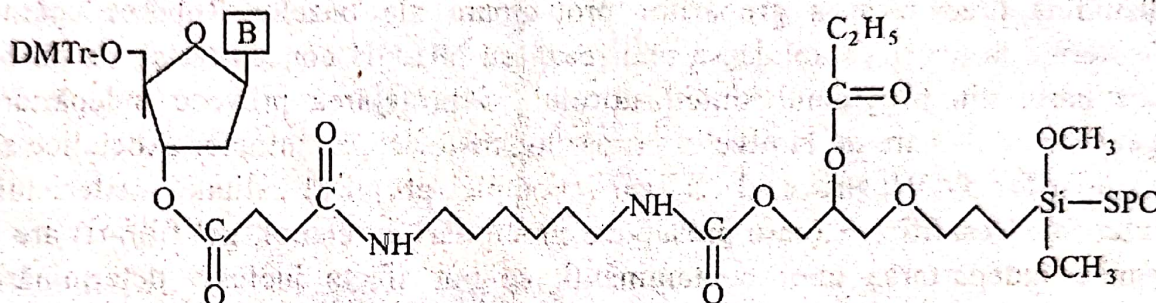


Fig. 57 – Derivat oligonucleotic, cu *spacer*.

Monomerii sunt molecule care conțin o grupare reactivă trivalentă de tip fosfoamidit, din care se obțin fosfatdiesteri internucleotidici. În funcție de aparat și de cerințe, sinteza respectivă se poate realiza la diferite scări, cu un randament de circa 50% după purificare (tabelul 10).

Tabelul 10

Sinteza automată a ADN; randamentul brut de 20 de meri (Andrus, 1995)

Scara de sinteză	A_{260} *	mg**	nmol
40 nmol	5–10	0,16–0,33	20
0,2 μ mol	20–30	0,66–1,0	100
1 μ mol	100	3,3	500
10 μ mol	800	26	4000

* A_{260} este exprimată în unități de absorbție la 260 nm per ml, în cuve de cuarț cu drum optic de 1 cm.

** 1 unitate A_{260} corespunde la circa 33 μ g ADN monocatenar.

Materialul inițial este reprezentat de un suport solid (sticlă cu pori controlați SPC), la care primul nucleozid se atașează printr-o legătură 3'-esterică. De menționat că poziția 5'-OH este protejată tranzitoriu cu DMTr, iar grupările reactive ale bazelor sunt blocate cu *i*Bu sau Bz. În continuare, prin intermediul unor legături fosfat internucleotidice, se adăunează monomeri nucleozid-3'-monofosfați, în care există

de asemenea grupări protectoare specifice pentru 5'-OH și pentru baze, precum și *o*-clorofenil pentru gruparea fosfat. Îndepărtarea 5'-DMTr se face printr-un scurt tratament cu Cl_2CHCOOH . Urmează adăugarea nucleozidului monomer, împreună cu agentul de cuplare MSNT (1-mezitilensulfonil-3-nitro-1,2,4-triazol) și NMI (N-metilimidazol). După 15 min de reacție, gruparea 5'-OH rămasă nereacționată este blocată prin acetilare cu anhidridă acetică. Pentru noul ciclu de adiție, se face deprotejarea dinucleotidului format, adăugarea următorului monomer etc., în flux continuu în curent de argon. Prelucrarea după sinteză, înainte de analiză și purificare, include desprinderea de pe suport, îndepărtarea grupărilor protectoare, desalifierea. Obținerea produsului proiectat presupune îndepărtarea resturilor *o*-clorofenil, prin tratament cu *syn*-2-nitrobenzaldoximă și tetrametilguanidină, precum și a grupărilor protectoare ale bazelor. Ruperea legăturii 3'-esterice la matricea solidă se realizează cu NH_4OH concentrat și, de obicei, face parte din programul sintetizatorului. Deprotejarea prevede îndepărtarea agenților de blocare de la nivelul grupărilor fosforice, a aminelor exociclice sau a grupărilor 5'-OH; procesul realizat incomplet grevează calitatea materialului sintetizat. Desalifierea (care presupune precipitări cu etanol, gel-filtrări) are ca urmare îndepărtarea unor contaminanți, ce pot afecta inclusiv determinările spectrofotometrice. 5'-DMTr este scindat cu CH_3COOH , după o purificare prealabilă prin cromatografie a oligonucleotidului sintetizat. În general, pentru moleculele bogate în purine se impune o purificare suplimentară prin HPLC sau prin electroforeză preparativă, ceea ce nu este obligatoriu pentru secvențele bogate în pirimidine. Varianta optimă de sinteză cu ajutorul fosfatriesterilor (Gait și colab., 1982; Sproat și Bannwarth, 1983) este cea schematizată în fig. 58.

Metoda permite obținerea unor oligomeri de 20–30 nucleotide, lungimea maximă fiind mai ușor de realizat pentru secvențe bogate în pirimidine.

Solvenții cei mai utilizați sunt pirimidina, dioxanul, dietileterul, tetrahidrofuranul, acetonitrilul, dicloretanul etc., de puritate maximă, lipsiți de contaminanți acizi sau bazici. Etanșeizarea perfectă a sistemului de lucru este de importanță critică, pentru evitarea pătrunderii urmelor de apă, a cărei prezență are efecte dramatice asupra randamentului de cuplare a monomerilor.

Pentru asigurarea unui randament cât mai ridicat de sinteză a oligonucleotidelor s-au imaginat molecule de mare reactivitate – așa numitele „baze universale” (Lin și Brown, 1989). Acestea includ un analog purinic care se leagă cu o afinitate comparabilă atât la timină, cât și la citozină, precum și un analog pirimidinic, care recunoaște în aceeași măsură adenina și guanozina. Datorită degenerării codului genetic, secvențele de ADN deduse pe baza structurii primare a polipeptidelor nu pot fi definite univoc, așa încât utilizarea „bazelor universale” este destinată eliminării sau reducerii numărului posibil de variante.

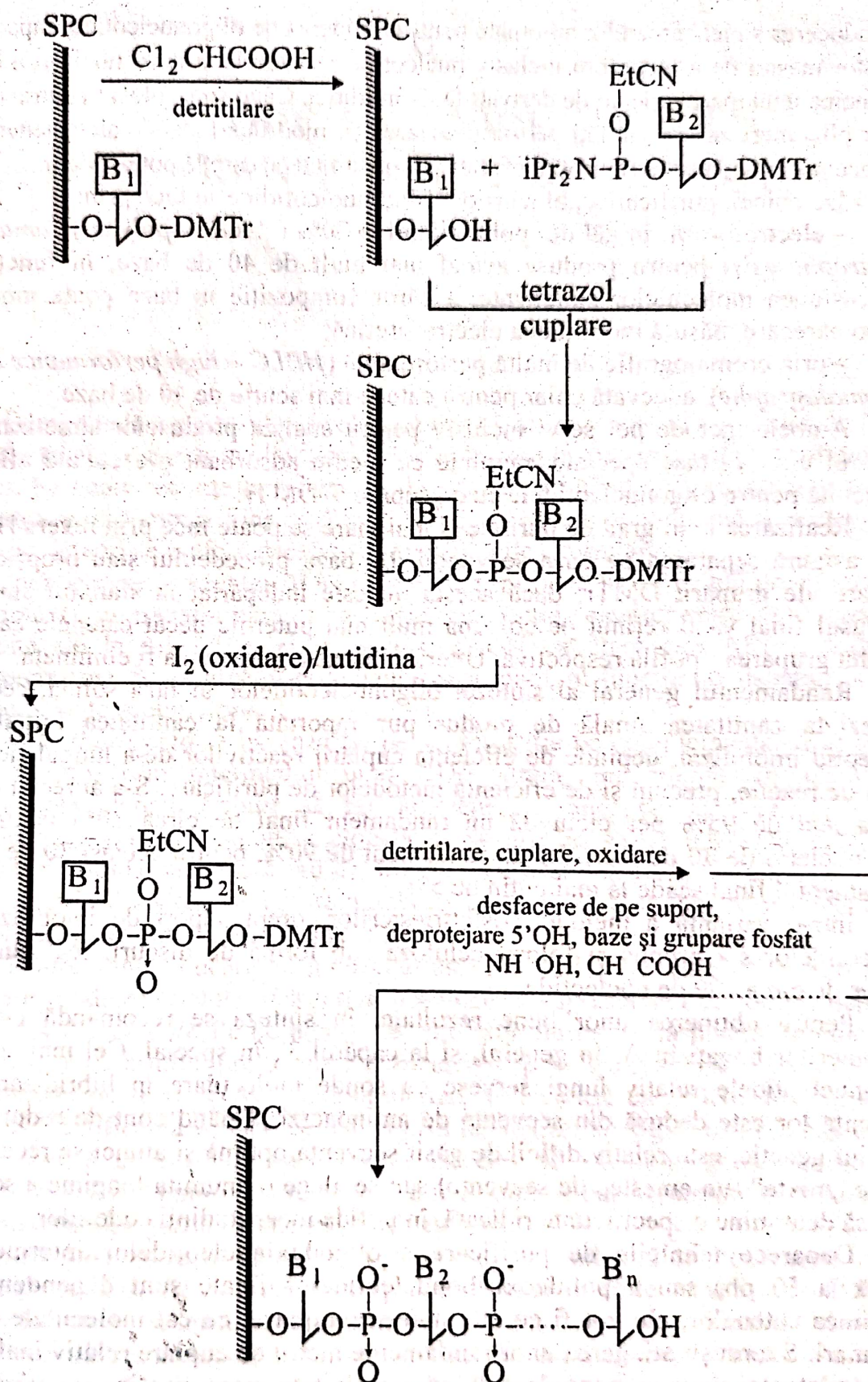


Fig. 58 – Schema de sinteză automată a oligonucleotidelor.

Introducerea sintetizatoarelor automate pentru obținerea de oligonucleotide, capacitatea acestor mașini de a incorpora inclusiv nucleotide nenaturale și acizi nucleici a dus la obținerea unei mari varietăți de derivați fosfoamiditici. Când sunt folosiți pentru sinteza unor oligomeri, aceste entități permit realizarea de modificări stabile ale catenei, ceea ce face posibil controlul riguros al efectelor biochimice pe care le pot provoca.

De obicei, purificarea „blocurilor” oligonucleotidice se face prin:

- electroforeză în gel de poliacrilamidă 20% (*PAGE – polyacryl amide gel electrophoresis*) pentru produse având mai mult de 40 de baze, în funcție de dimensiunea moleculelor sintetizate, a căror compoziție în baze poate modifica într-o oarecare măsură mobilitatea electroforetică;

- prin cromatografie de înaltă performanță (*HPLC – high performance liquid chromatography*), adecvată chiar pentru catene mai scurte de 40 de baze.

Ambele metode pot servi inclusiv pentru analiza produselor sintetizate, cu ajutorul unor cartușe speciale, umplute cu mediu adsorbant prezentând afinitate deosebită pentru oligonucleotidele cu o grupare 5'-DMTr.

Realizarea unui grad de puritate și mai mare se poate face prin revers HPLC, care asigură separarea pe baza secvenței. La baza procedurii stau proprietățile apolare ale grupării DMTr: dacă acesta nu este îndepărtat la sfârșitul sintezei, produsul final va fi reținut pe coloană mult mai puternic decât catenele care au pierdut gruparea lipofilă respectivă. Ulterior, această grupare va fi eliminată.

Randamentul general al sintezei oligonucleotidelor în fază solidă, ceea ce reprezintă cantitatea finală de produs pur raportată la cantitatea inițială de nucleotid imobilizat, depinde de eficiența cuplării reactivilor de-a lungul fiecărui ciclu de reacție, precum și de eficiența metodelor de purificare. S-a apreciat că un randament de 95% per ciclu dă un randament final de circa 20% pentru un oligonucleotid de 30 de meri. La un randament de 90%, pentru aceiași 30 de meri, randamentul final scade la mai puțin de 5%.

Într-o variantă a metodei fosfatriesterilor, drept suport de imobilizare a nucleotidelor s-a propus și folosit celuloza sub formă de discuri, realizându-se catene de circa 100 de nucleotide.

Pentru obținerea unor bune rezultate, în sinteză se recomandă evitarea oligomerilor bogați în A, în general, și la capătul 3', în special. Cel mai adesea, oligonucleotidele relativ lungi servesc ca sonde moleculare în hibridizare, iar secvența lor este dedusă din secvența de aminoacizi. Ținând cont de redundanța codului genetic, este relativ dificil de găsit secvența optimă și atunci se recurge la sonde „mixte” (un amestec de secvențe) sau se alege o anumită lungime a sondei, care să determine o specificitate ridicată, în pofida incertitudinii codonilor.

Deoarece tehnicile de purificare a oligodexinucleotidelor intermediare (până la 50 pb) sau a polideoxiribonucleotidelor finale sunt dependente de lungimea catenelor, ele vor fi cu atât mai avantajoase, cu cât moleculele vor fi mai mari. S-a reușit atingerea unor randamente medii de cuplare relativ înalte, pe baza existenței unor mononucleotide cu reactivitate mare și a intervenției unor catalizatori foarte eficienți.

METODE DE EVIDENȚIERE A TRANSFERULUI DE GENE

Etapa finală a procesului de clonare constă în *screening*-ul coloniilor de ADN recombinat, în vederea evidențierii celor care conțin secvența polinucleotidică de interes. Se poate recurge la selectarea directă, atunci când vectorii utilizați permit decelarea unui fenotip bine precizat, sau la o selectare indirectă a secvențelor urmărite; alteori se preferă decelarea produsului de exprimare.

Identificarea prezenței ADN recombinat introdus într-o celulă procariotă sau eucariotă (prin transformare, transfecție, lipofecție, electroporare etc.) poate fi realizată fie la nivelul acizilor nucleici (ADN ca atare sau ARNm transcris corespunzător), fie la nivelul proteinelor exprimate, în funcție de sistemul în care s-a lucrat și de scopul urmărit.

Selecția directă se bazează fie pe supresia, fie pe complementarea *in vivo* a unei mutații, prin intermediul unui ADN străin, recombinat. În acest caz, fragmentele clonate trebuie să fie suficient de lungi ca să cuprindă unități funcționale complete, iar gena clonată să se afle în gazda adecvată sistemului utilizat (plasmidă bacteriană sau de drojdie, fag, cosmidă etc.). Cu ajutorul acestei strategii, prin folosirea unui mare număr de mutanți, au fost clonate și selecționate numeroase gene din *E. coli*, drojdii, fungi etc.

Pentru genele eucariote, procedeul este mai dificil de aplicat. Pe de o parte, nu toate produsele genice respective pot duce la supresia sau la complementarea mutațiilor din *E. coli*. Pe de altă parte, existența intronilor la nivelul multor gene eucariote nu permite prelucrarea (*processing* prin *splicing*) în bacterie; acest impediment poate fi depășit dacă la clonare se lucrează cu ADNc. Însă în aceste condiții identificarea se face de obicei prin tehnici imunologice sau biologice, deși uneori există și posibilitatea selecției directe; de exemplu, gena dihidrofolat-reductazei (DHFR) murine a fost clonată în *E. coli* pe baza fenotipului, deoarece ea conferă celulelor gazdă rezistență la trimetoprim.

Selecția indirectă detectează existența recombinanților de interes într-o populație celulară fie prin decelarea prezenței unei anumite secvențe de ADN, fie prin evidențierea produsului de exprimare a acesteia, fie utilizând ambele căi.

Una dintre metodele cele mai folosite în identificarea clonelor de interes într-o bibliotecă (de gene) constă în hibridizarea acizilor nucleici implicați, cu ajutorul sondelor moleculare specifice, de tip ARN sau ADN. Se face apel la

hibridizarea *in situ* a coloniilor: replica acestora este preluată pe membrane (de nitroceluloză sau alte suporturi), supusă lizei alcaline, hibridizării și vizualizării prin mijloace apropiate.

În cazul unor gene din celulele specializate, care codifică ARNm de un anumit tip în cantitate mare, se poate recurge la traducerea „arestată” prin hibridizare (*hybrid-arrested translation*): dacă într-un sistem acelar de traducere ARNm este hibridizat cu secvențele ADN complementar corespunzător, exprimarea genei nu va mai avea loc. Prin compararea rezultatelor cu martorul de sistem în care ARNm nu este hibridizat, se poate stabili prezența secvenței de interes. Metoda se poate aplica speciilor de ARNm cu o abundență de până la 0,1% în ARNm celular total.

Metodele imunochimice de detecție a clonelor cu ADN recombinat se pot aplica doar cu condiția exprimării proteinelor codificate de gena heteroloagă. În acest caz, nu se observă modificări fenotipice ale gazdei folosite la transformare, în schimb este necesară prezența unor anticorpi specifici. Posibilitatea obținerii unor anticorpi monoclonali permite detectarea strictă a anumitor determinanți antigenici din molecula polipeptidului exprimat.

6.1. TEHNICI DE DECELARE A ACIZILOR NUCLEICI

Introducerea unei molecule ADN himeră într-o populație celulară duce la îmbogățirea patrimoniului genetic al sistemului respectiv, conferindu-i noi proprietăți, cum ar fi rezistența la anumite droguri. Acest considerent este folosit la selecția celulelor transformate/transfectate, care astfel au dobândit, de exemplu, un marker de rezistență la antibiotice. Formarea de colonii celulare în prezența factorului de selecție constituie un prim indiciu că s-a reușit manipularea celulelor. Decelarea ADN recombinat în populația de celule modificate se poate face pe ADN celular total sau direct pe ADN plasmidial izolat sau se pot folosi tehnici *in situ*, care permit nu numai evidențierea acidului nucleic de interes, ci și localizarea sa intracelulară. S-a pus la punct un mare număr de metode care să ducă la decelarea transferului de informație într-un sistem dat, cum ar fi:

6.1.1. RESTRICȚIA ENZIMATICĂ

Alături de selecția pe medii sau gazde care acceptă doar multiplicarea acelor celule în care s-a introdus informație genetică suplimentară, reacția de restricție enzimatică este un procedeu relativ simplu de evidențiere a prezenței recombinatului într-o anumită populație. Prin metode adecvate se izolează ADN plasmidial (v. manualele de tehnici Sambrook și colab., 1989; Perbal, 1988 etc.), care apoi este supus digestiei cu enzimele apropiate, rezultând un număr variabil de fragmente polinucleotidice liniare, în funcție de situsurile de restricție existente

în molecula de evidențiat. Electroforeza în gel de agaroză separă speciile de ADN; compararea cu un marker de masă moleculară permite evaluarea dimensiunilor fragmentelor caracteristice rezultate. Dacă în final se obțin fragmente cu mase egale celor calculate, înseamnă că în materialul inițial supus analizei (celulele modificate genetic) există ADN recombinat. De cele mai multe ori, se face apel la excizia ADN insert (pasager) din ligatul cu vectorul, așa încât rezultă doar două fragmente, cu mase bine precizate.

6.1.2. HIBRIDIZAREA ACIZILOR NUCLEICI

Factorii denaturanți (căldură, mediu alcalin etc.) duc la desfacerea structurii secundare, reprezentată de legăturile de hidrogen inter- sau intracatenare din moleculele acizilor nucleici. Anularea factorilor care au provocat disocierea dublului helix duce la renaturare prin reasociere-reordonare. Dacă lanțurile monocatenare aparțin unor molecule diferite, refacerea structurii dublu catenare este denumită *hibridizare*. În acest condiții, se pot forma diverse tipuri de molecule bicatenare ADN:ADN, ADN:ARN, ARN:ARN, a căror stabilitate este condiționată și caracterizată de T_m , care precizează condițiile termice de formare a hibrizilor. La rândul său, această valoare depinde atât de compoziția în baze azotate G+C, cât și de alți factori (de lungimea catenei sau de mediu – tăria ionică, concentrația agenților denaturanți etc.).

Complementaritatea 100% a fragmentelor nucleotidice implicate duce la formarea unor hibridi specifici, foarte stabili, servind la identificarea și localizarea secvențelor de interes. Pentru realizarea reacției de hibridizare se folosesc *sondele moleculare* (secvențe oligo- sau polinucleotidice cu structură primară determinată, complementară zonelor de studiat, numite *țintă*). Sonda trebuie să aibă caracteristici bine definite (specificitate, dimensiune etc.) și să fie decelabilă după hibridizare (marcarea sondelor se poate realiza radioactiv – „cald” sau „rece” – cu încorporarea de nucleotide modificate prin legarea covalentă a biotinei, digoxigeninei, fluoresceinei etc.).

Hibridizarea se realizează adoptând diferite strategii, lucrând în sisteme omogene (în soluție) sau heterogene (pe suport solid: membrane de nitroceluloză, nylon, polivinilidenfluorură, plăci de polistiren etc.). Pentru identificarea prezenței ADN recombinat introdus într-o celulă procariotă sau eucariotă se poate apela la diferite tehnici de hibridizare. Unele presupun izolarea prealabilă a acidului nucleic de identificat și separarea electroforetică a diverselor specii moleculare (*Southern blot* – identificarea secvențelor ADN; *Northern blot* – identificarea secvențelor ARN) sau nu prevăd separări de specii moleculare (*dot/slot blot*), altele permit inclusiv localizarea intracelulară a acidului nucleic în general, a recombinatului în special (așa-numitele tehnici *in situ*). Indiferent de varianta tehnică folosită, principiul hibridizării este cel prezentat în fig. 59.

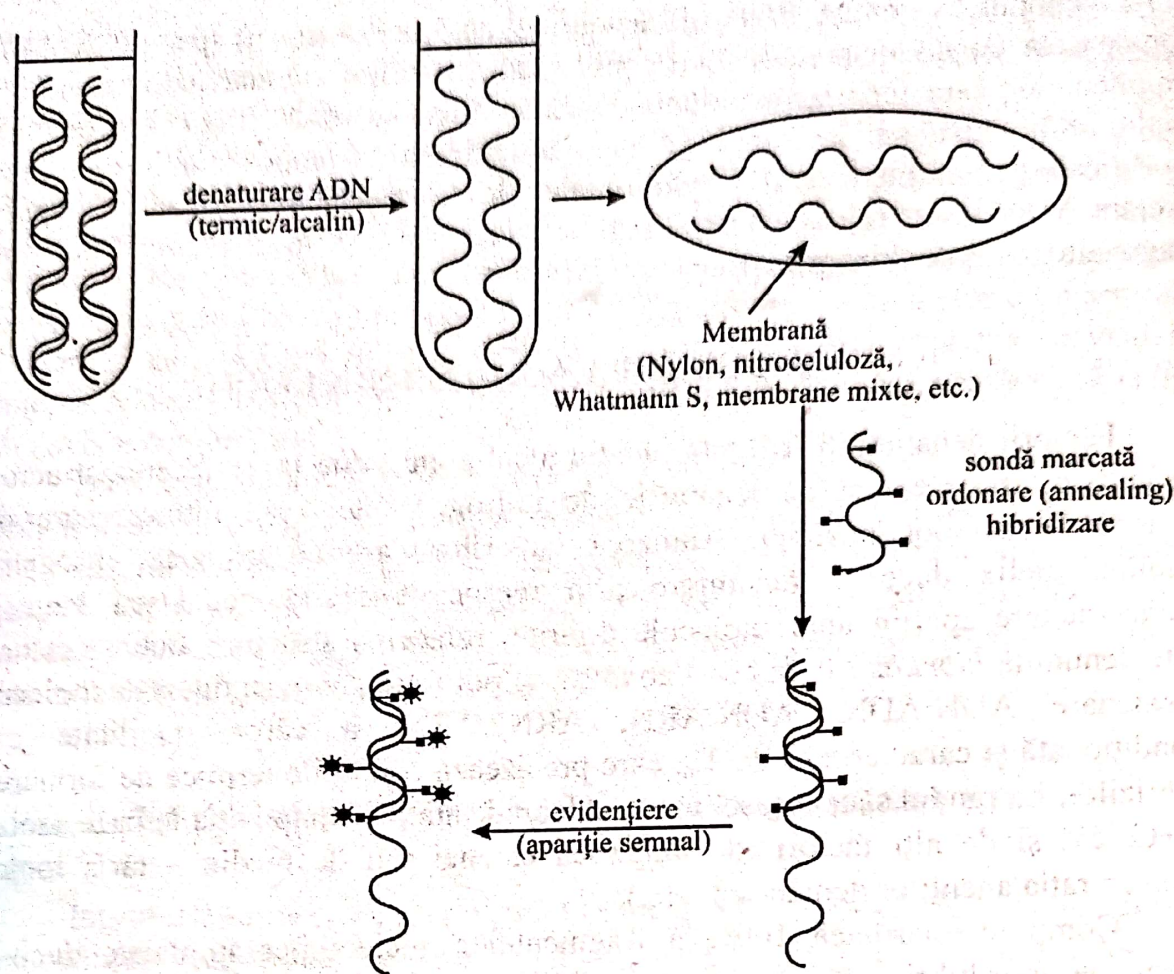


Fig. 59 – Principiul hibridizării acizilor nucleici.

Decelarea semnalului de hibridizare fie pe ADN izolat din celulele receptoare ale recombinatului, fie *in situ* constituie o dovadă a reușitei transferului de informație.

6.1.3. REACȚIA DE AMPLIFICARE POLIMERAZICĂ (PCR)

Această metodă constă în amplificarea enzimatică *in vitro* a secvențelor ADN, prin repetarea ciclică a unui modul de trei etape, în aceeași ordine pentru fiecare ciclu: denaturarea ADN țintă (de analizat), amorsarea sintezei ADN cu primeri specifici secvenței de identificat (*annealing*), elongarea sau extensia primerilor sub acțiunea unei ADN polimeraze termorezistente. Pe parcursul fiecărui ciclu, o moleculă ADN bicatenară este disociată în cele două monocatene componente, la ale căror capete 3' se ordonează prin complementarizare primerii corespunzători; de la aceste amorse se realizează extensia catenelor-fiice, în direcția 5'→3'. Lungimea produșilor de elongare este condiționată de lungimea secvenței flancate de către primeri. La rândul lor, catenele-fiice vor lega aceiași primeri, iar apoi reacția continuă (fig. 60).

După terminarea reacției, produsul obținut – *ampliconul* – este separat electroforetic și caracterizat din punct de vedere al masei sale moleculare (exprimată în pb). Pentru confirmarea rezultatului se poate face apel și la alte metode, cum ar fi hibridizarea.

În fiecare caz se aleg parametrii optimi ai reacției de amplificare:

- temperaturile de realizare a etapelor din cadrul modulului și numărul de cicluri;
- concentrațiile dNTP (care trebuie să fie echimolare și să asigure un bun echilibru între randamentul/specificitatea/fidelitatea reacției);

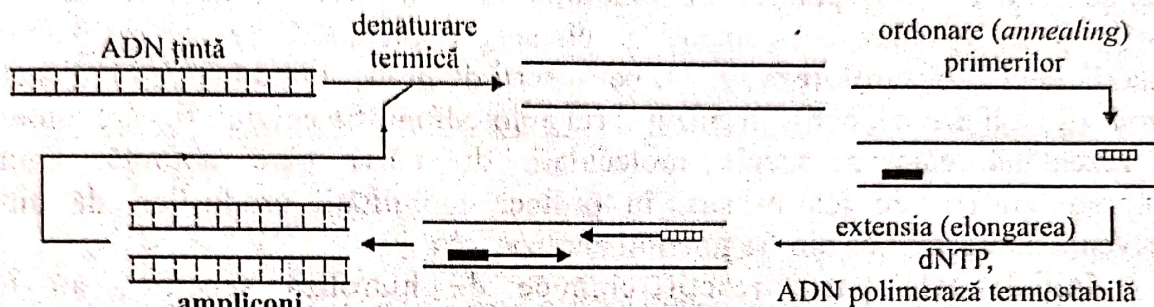


Fig. 60 – Principiul reacției de amplificare polimerazică (PCR).

- concentrațiile ionilor de Mg^{2+} (variabilă-cheie pentru asigurarea specificității);
- tipul și concentrația polimerazei, preferabile fiind enzimele cu termostabilitate ridicată și cu proprietate marcată de *proofreading*;
- de foarte mare importanță în obținerea unui rezultat clar la PCR este designul *primerilor*; în general, aceste amorse au 15–20 b, dar pot ajunge și până la 40 de nucleotide. Realizarea unor performanțe ridicate la PCR impune alegerea unor secvențe cu un conținut de 50–60% G+C, al căror $T_m = 55^\circ - 80^\circ C$. De asemenea, se va elimina autocomplementarizarea, în special la capetele 3', în acest scop fiind de evitat existența 3'T, nucleotidul cel mai puțin discriminatoriu;
- mediul ionic furnizat de către tamponul de PCR (prezența NaCl, a sărurilor de amoniu, a unor detergenți neionici, eventual a gelatinei ca stabilizator de polimerază etc.).

6.1.4. DETERMINAREA SECVENȚEI BAZELOR

Dacă prezența pasagerului în vector poate fi dovedită indirect, prin apariția în sistemul biologic a proprietăților specifice pasagerului, dovada directă a prezenței insertului legat covalent la vector se realizează prin analiza lui chimică, ce trebuie să arate că fragmentul inserat are aceeași secvență cu fragmentul de la care s-a pornit. Pentru determinarea structurii primare a ADN au fost propuse diverse metode, perfecționate de-a lungul timpului, elaborate pe baza a două strategii: una pe baza reacțiilor chimice (cum ar fi prototipul propus de Maxam și Gilbert, 1977), cealaltă recurgând la reacțiile enzimatică (Sanger și colab., 1977), cu variantele lor, unele pretându-se la automatizare. În general, datorită perfecționării vectorilor care permit clonarea și secvențializarea ADN într-un sistem unic, simplificând operațiile, metodele enzimatică se bucură de un interes crescând, fiind preferate.

6.1.4.1. Metoda Maxam și Gilbert (1977). Principiul metodei prevede digestia moleculei ADN de analizat cu enzime de restricție și marcarea fragmentelor la capătul 5' (în varianta inițială cu ^{32}P , folosind fosfatază alcalină). Metoda nu implică o copiere a moleculei ADN *in vitro*. După marcarea urmează hidroliza chimică, folosind agenți specifici celor patru baze. Clivarea se face parțial la fiecare bază, rezultând produși de reacție cu dimensiuni cuprinse între capătul marcat și baza respectivă. Aceștia sunt separați electroforetic în gel de poliacrilamidă 20%, puterea de rezoluție reușind să pună în evidență chiar diferențe de lungime determinate de un singur nucleotid. Se recurge la patru reacții, deci la electroforeză se pun patru serii de probe. Fiind marcați radioactiv, produșii de hidroliză pot fi localizați prin autoradiografia gelului, fiecare dintre ei reprezentând câte o specie moleculară de masă bine definită. Citirea autoradiografiei, de jos în sus, în ordinea mobilității produșilor, dă direct secvența nucleotidelor din fragmentul analizat.

Inițial, cele patru reacții chimice de hidroliză specifică au fost următoarele:

- *clivarea preferențială la G* (reacția $G > A$) – care are la bază proprietatea guaninei de a se metila cu dimetilsulfat de cinci ori mai rapid decât adenina, provocând instabilitatea legăturii glicozidice, care se rupe mai rapid la G decât la A, pe autoradiografie benzile puternice corespunzând G, iar cele slabe – A;

- *clivarea preferențială la A* (reacția $A > G$) – bazată pe faptul că legătura glicozidică a adeninei metilate este mai slabă decât cea a guanozinei metilate, așa încât la hidroliză blândă benzile A vor fi puternice, iar cele G – mai slabe;

- *clivarea la C și T* ($C+T$) – are loc după hidrazinoliza ADN în dreptul ambelor baze, pe autoradiografie apărând benzi de intensitate relativ identică pentru amândouă componentele;

- *clivarea la citozină (C)* – făcută prin hidrazinoliză controlată, adică în prezența NaCl 2M, care inhibă reacția timinei, ceea ce face ca pe autoradiografie să apară doar benzi corespunzătoare C; prin eliminare față de reacția anterioară se stabilesc pozițiile pentru timină. Un exemplu de secvențializare prin metoda Maxam și Gilbert este prezentat în fig. 61.

Pentru evitarea ambiguităților care apăreau la citirea secvenței în varianta originală, metoda Maxam și Gilbert a fost modificată. În acest caz, se recurge la șase reacții specifice, dar principiul este același:

- *reacția $G + A$* impune piperidinoliza la $37^\circ\text{C}/60$ min;

- *reacția $A > C$* prevede hidroliza cu NaOH 1,2 M la $90^\circ\text{C}/45$ min, preferențial la nivelul A, la autoradiografie benzile C fiind mult mai slabe;

- *reacția G* recurge la metilarea în condiții speciale cu dimetilsulfat, care are afinitate mai mare pentru această bază;

- *reacția $C+T$* se realizează prin hidrazinoliza ADN la $20^\circ\text{C}/35$ min;

- *reacția C* se petrece în prezența NaCl 5M;

- *reacția T* implică tratarea ADN cu piperidină 45 min la 25°C .

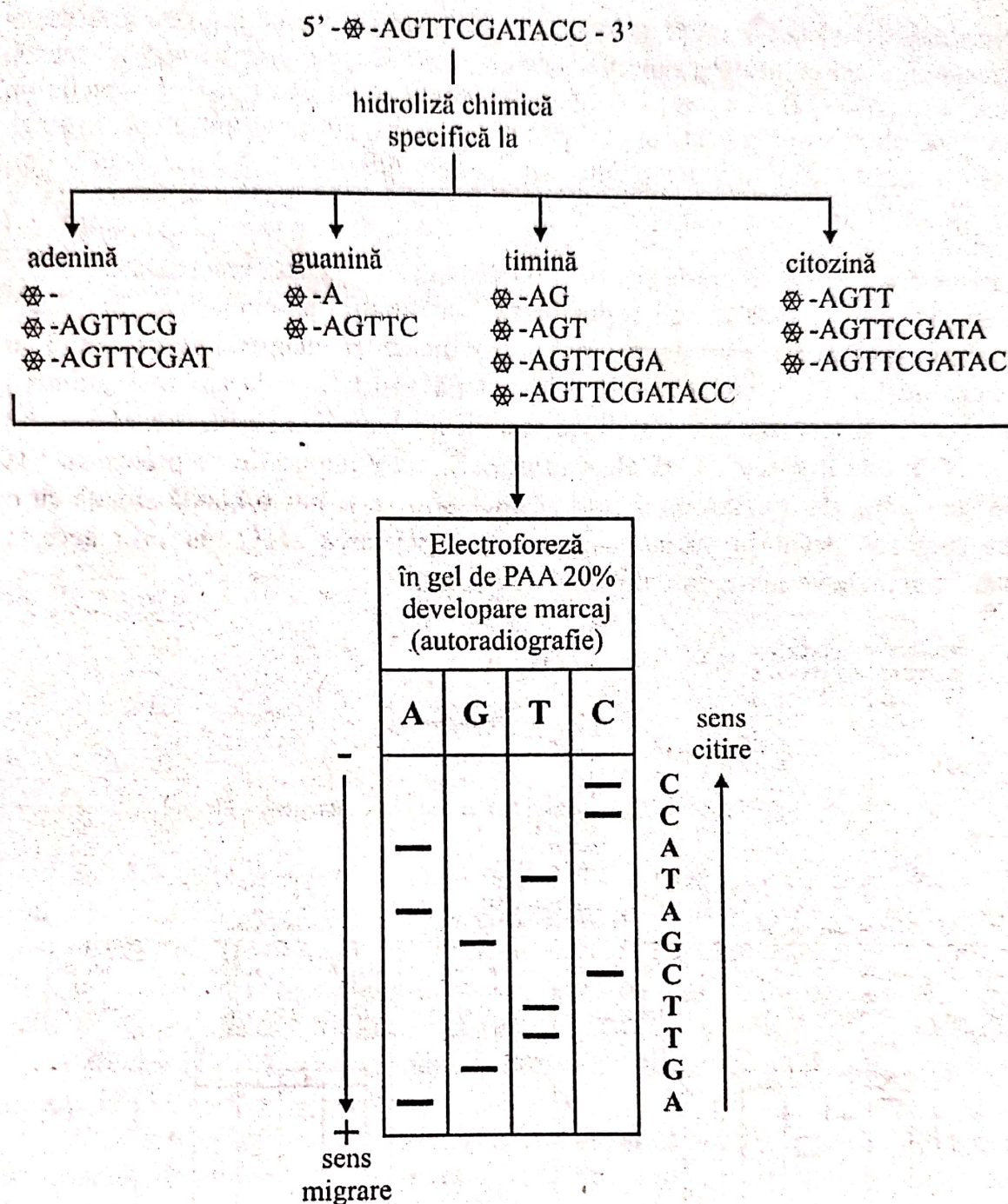


Fig. 61 – Schema secvențializării acizilor nucleici după Maxam și Gilbert.

6.1.4.2. Metoda Sanger și Coulson (1977). Cronologic, metoda enzimatică de secvențializare este anterioară metodei chimice, ADN de analizat fiind utilizat ca matriță pentru sinteza *in vitro*. Se obțin fragmente ADN de 15–300 de nucleotide, separate electroforetic în funcție de dimensiune și „citite” în modul menționat anterior. Metoda se poate folosi în două variante, denumite „minus” și „plus”, principal asemănătoare, bazate pe utilizarea anumitor enzime.

Astfel, în varianta „minus”, ADN polimeraza I din *E. coli* sintetizează catena complementară celei de secvențializat. Reacția are loc în prezența celor patru dNTP

(marcați radioactiv) și are drept rezultat un set de fragmente cu lungimi diferite, al căror capăt 3' (corespunzător primerului) este identic. După o primă etapă de sinteză, se îndepărtează dNTP în exces, iar incubarea continuă în patru serii de reacție, în fiecare fiind absent pe rând câte unul dintre cei patru dNTP din prima etapă. În final, apar patru amestecuri de oligodeoxinucleotide, care diferă între ele printr-un singur nucleotid. După sinteză, se face o denaturare a materialului, pentru desprinderea de pe matriță a catenelor noi. Analiza se realizează prin electroforeză în gel denaturant (poliacrilamidă), autoradiografie și citirea secvenței ca și în cazul precedent.

În varianta „plus”, se exploatează caracterul exonucleazic al ADN polimerazei fagului T4, care degradează ADN bicatenar începând cu capătul 3' al oligodeoxinucleotidelor sintetizate în prima etapă, menționată la varianta „minus”. Și de această dată se fac patru serii de reacții, iar hidroliza se blochează la unul dintre dNTP din amestec. După electroforeză și autoradiografie se procedează la citirea secvenței, dar poziția unui anumit nucleotid va fi într-o bandă situată cu o unitate mai sus decât în varianta „minus”. Descifrarea secvenței prin această metodă, în ambele variante, este ilustrată de fig. 62.

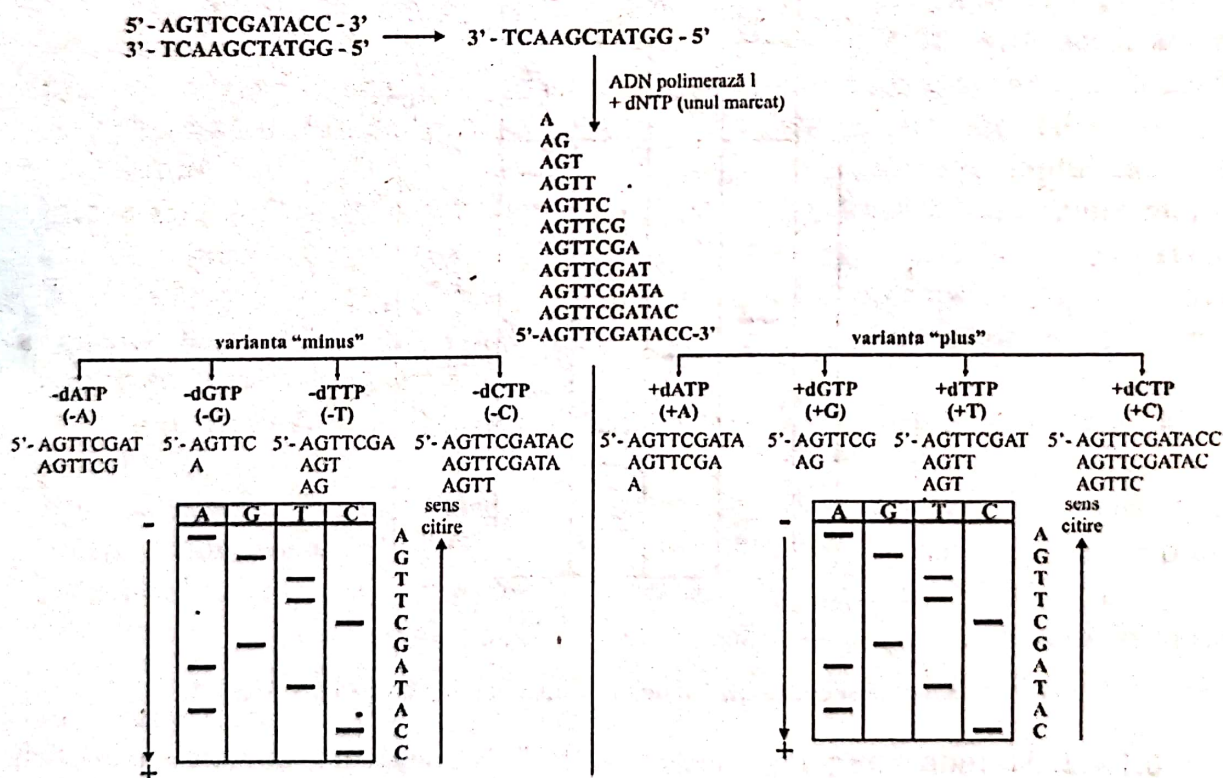


Fig. 62 – Schema secvențializării acizilor nucleici după Sanger și Coulson.

6.1.4.3. Metoda dideoxinucleotidelor (metoda Sanger și colab., 1977). Are la bază terminarea procesului de elongație a lanțului în cursul sintezei cu ajutorul dideoxinucleozidtrifosfaților (ddNTP). ADN de analizat are rol de matriță și, în patru serii de reacții, este incubat cu ADN polimerază I, cu primerul corespunzător,

bacteriene-gazdă, de *E. coli* K12 (obținându-se cele denumite JM101, JM105, JM107 etc.): introducerea acestor vectori, conținând operonul *lacZ*, în celule defective în gena *gal* (tulpini *E. coli* lac^-) duce la refacerea activității β -galactozidazice. Fagul M13 cultivă pe bacterii având factorul de sex F situat pe un ADN epizomal în care se regăsește regiunea *Pro* deletată din cromozomul bacterian; cultivarea timp îndelungat pe mediu cu prolină ar putea duce la apariția unei populații celulare rezistente la infecția fagică, ceea ce impune o mare strictețe în ceea ce privește mediul de menținere și creștere a bacteriei-gazdă. La replicarea ADN circular monocatenar al fagului M13 (ADN+) apar forme replicative bicatenare (FRI), cu rol de *template* în sinteza genomului viral. Vectorii menționați anterior au fost construiți prin modificarea FRI, rezultând perechile M13mp8/M13mp9, M13mp10/M13mp11 etc., care permit clonarea fragmentului ADN în ambele orientări, situsurile de inserție având aranjare inversă. Acest fapt constituie un avantaj, deoarece secvența poate fi determinată începând de la ambele capete, cu folosirea unui singur *primer*. Mai mult, au fost sintetizați *primeri* universali, întrucât ADN este clonat într-o singură regiune a ADN M13; de asemenea, au fost preparați și *primeri* pentru secvențializarea inversă, care se ordonează prin complementarizare (*annealing*) doar la catena în orientare negativă.

Inițial, pentru secvențializare s-a utilizat marcajul radioactiv, pentru sinteza ADN complementar efectuându-se patru serii de reacții separate, în fiecare amestec existând câte un dNTP cu ^{32}P sau ^{35}S , plus un ddNTP. Pentru a se putea recurge la automatizarea citirii secvenței, dar și pentru eliminarea factorului de risc al lucrului cu izotopi, s-a recurs la metode de marcarea „rece”, neradioactivă, cu fluorofori specifici fiecărei baze (Smith și colab., 1986) – dacă electroforeza se execută pe un singur gel, sau cu același fluorofor – dacă electroforeza se face pe patru geluri diferite.

Pentru secvențializarea ARN, la ora actuală, se recurge fie la o metodă derivată de la ADN (metoda Peattie, 1979; este o variantă a metodei Maxam și Gilbert), fie – cel mai adesea – se aplică o metodă indirectă, lucrându-se pe molecule de ADNc corespunzător sintetizat prin reverstranscriere, ceea ce a simplificat determinarea structurii primare a unor molecule cu stabilitate redusă cum sunt cele ARN.

6.2. TEHNICI DE DECELARE A PROTEINELOR EXPRIMATE

Utilizarea uneia sau mai multor metode din cele prezentate mai sus permite detecția ADN insert în celule modificate genetic. Dacă se urmărește și/sau exprimarea ADN pasager, atunci aceste informații trebuie să fie corelate cu cele care decelează apariția în sistem a proteinei de interes, codificate. Tehnicile respective au la bază interacțiunea dintre polipeptid (proteină) – cu rol de antigen și anticorpii corespunzători. Se poate recurge la metode imunoenzimatice de decelare tip *EIA* (*enzymic immuno assay*), tip *ELISA* (*enzyme linked immunosystem assay*) sau tip *Western blot*.

6.2.1. ANALIZA WESTERN BLOT

Îmbină separarea electroforetică a polipeptidelor (în gel de acrilamidă, în condiții denaturante, sau în gel de agaroză) cu imunodectia. Prezintă avantajul că se poate lucra și cu amestecuri proteice nepurificate. Investigația imunologică se realizează pe diferite tipuri de membrană (nitroceluloză, polivinilidenfluorură), după transferul electric sau prin difuzia pasivă a moleculelor separate electroforetic. Centrii nespecifice de legare de pe suprafața membranelor se blochează cu diverși agenți (serumalbumină bovină, lapte praf degresat etc.), iar apoi se face incubarea cu anticorpi primari, specifici pentru proteina de interes și apoi cu conjugat antiIgG cuplat cu o enzimă (fosfatază alcalină sau peroxidază). Prezența polipeptidului de decelat – sub forma unei benzi localizate exclusiv la nivelul masei moleculare estimate – se evidențiază după dezvoltarea reacției cu substratul adecvat (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfat BCIP/nitro blue tetrazoliu NBT pentru fosfatază sau 4-cloro-1-naftol, în prezența apei oxigenate pentru peroxidază). În funcție de protocolul de lucru, într-un interval de timp de 30–130 min se pot evidenția 1 ng, respectiv 50 pg antigen.

6.2.2. ELISA

Dacă amestecul de proteine/polipeptide de analizat nu se supune electroforezei, pentru decelarea antigenului de interes se poate recurge la o investigație în care proba se depune pe o placă de polistiren specială. După aderarea polipeptidelor la pereții godeurilor plăcii, principal se urmăresc aceleași etape ca și la Western blot: îndepărtarea excesului de probă, blocarea situsurilor nespecifice de legare, adăugarea anticorpului primar și apoi a celui secundar, marcat enzimatic, și – în final – a substratului corespunzător. În urma reacției enzimatică se dezvoltă un produs solubil în mediul de lucru; intensitatea de culoare – proporțională pe un anumit domeniu cu concentrația proteinei de interes – se citește (spectro)fotometric.

APLICAȚII

Cele prezentate anterior au demonstrat că tehnologia ADN recombinat a inaugurat era intervenției umane asupra patrimoniului genetic al organismelor. Așadar, la ora actuală există un ansamblu de tehnici pe care societatea umană le poate exploata în beneficiul său. Realizările tehnologiei ADN recombinat, la fel ca și potențialele sale aplicații, pot fi grupate în două categorii, una de ordin fundamental și cealaltă de ordin practic. Din categoria realizărilor fundamentale pot fi citate următoarele:

- descifrarea modului de organizare a genelor în cromozomi;
- stabilirea hărții genetice a numeroase organisme, de la cele simple – procariote, unicelulare, spre cele eucariote – complexe, pluricelulare (inclusiv omul);
- studiul fizic și chimic al unor gene (secvențializarea segmentelor de acid nucleic corespunzător);

– studiul mecanismelor de exprimare și de reglare genică;

– stabilirea genelor virale și/sau celulare responsabile de inducerea unor tumori.

Dintre realizările de ordin practice se pot aminti:

– obținerea de noi organisme, modificate genetic, producătoare de molecule de interes medical, industrial sau alimentar;

– obținerea de plante alimentare sau industriale modificate genetic pentru inducerea rezistenței la factori de mediu agresivi (secetă, îngheț, dăunători etc.), pentru producerea unor proteine cu valoare nutritivă crescută sau care nu mai au nevoie de îngrășăminte chimice;

– obținerea de noi rase de animale, cu productivitate sporită;

– repararea unor defecte genetice prin terapie genică etc.

Din cele de mai sus rezultă că medicina, biologia, agricultura, zootehnia sunt principalii beneficiari ai tehnologiei ADN recombinat. Până în acest moment au fost clonate numeroase gene, multe dintre ele de interes, exprimând proteine cu rol esențial în reglarea proceselor metabolice, însă a căror concentrație normală în fluidele biologice este foarte scăzută. Cel mai adesea, moleculele respective – cu proprietăți farmacologice deosebite – nu pot fi concentrate și purificate prin metodele convenționale, tehnologia ADN recombinat oferind o cale alternativă de obținere a proteinelor vizate în cantități mari, relativ ieftine, necesare diverselor terapii. Exprimarea genelor străine în sisteme diferite de cele „naturale” ridică o

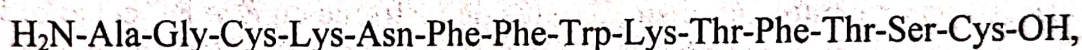
serie de probleme, care au putut fi depășite prin folosirea unor vectori adecvați sau prin sinteza unor proteine de fuziune.

În continuare sunt prezentate câteva strategii, folosite pentru sinteza unor proteine de interes medical, ilustrative pentru realizările și pentru potențialul acestei tehnologii neconvenționale. Exemplele au fost alese atât din punct de vedere al valorii lor istorice, cât și pentru demonstrarea diverselor modalități de abordare a problemelor. Lista aplicațiilor imediate este mult mai largă.

7.1. OBTINEREA SOMATOSTATINEI

Hormonii sunt mesageri moleculari, produși de către glande specializate, de unde sunt transportați la organele țintă, a căror funcție o reglează. Deficiențele sintezei moleculelor de hormoni se traduc prin disfuncții majore tratate prin terapie de înlocuire.

Somatostatina umană a fost primul polipeptid al unui organism superior produs cu succes într-o bacterie. Este un hormon format din 14 aminoacizi, cu structura:



sintetizat de către hipotalamus, de unde a și fost izolat pentru prima dată. Rolul somatostatinei constă în reglarea (prin inhibare) a secreției altor hormoni, între care hormonul de creștere, insulina și glucagonul. Somatostatina este astfel un agent terapeutic în diverse maladii, cum ar fi acromegalia, pancreatita acută, diabetul insulino-dependent.

În mod clasic, somatostatina era obținută prin procedee complicate de fracționare a proteinelor din extractele de hipotalamus; pe de altă parte, s-a făcut apel și la sinteza ei directă din aminoacizii corespunzători, metodă extrem de laborioasă. Ambele variante duc la un preț foarte mare pentru produsul pur, de uz medical uman. Tehnologia ADN recombinat a oferit o soluție ingenioasă și avantajoasă pentru producerea hormonului: pe baza secvenței aminoacizilor din molecula de somatostatină s-a făcut designul genei, iar apoi aceasta a fost sintetizată prin procedee chimice. În acest caz, s-a utilizat metoda fosfotriesterilor, pusă la punct de către Itakura și colab.(1977).

Din structura de aminoacizi a moleculei s-a dedus structura genei, ținând cont de degenerarea codului genetic, oarecum arbitrar (întrucât se pot prezice și alte secvențe nucleotide):

GCT GGT TGT AAG AAC TTC TTT TGG GAA TCA CTT TCA CTT TCA GCT TGT
CGA CCA ACA TTC TTG AAG AAA ACC CTT AGT GAA AGT GAA AGT CGA ACA.

A fost ales designul de mai sus, luându-se în considerare diverși factori, cum ar fi preferința sistemului celular *E. coli* (folosit în continuare pentru exprimare) pentru anumiți codoni, precum și evitarea unor zone bogate în AT, regăsite în

special în regiunea terminatorului. La sinteza chimică a genei au fost de asemenea avute în vedere câteva condiții: alegerea oligonucleotidelor din care s-a construit gena nu trebuia să permită complementarizarea nedorită inter- și intramoleculară; capătul 5' de pe o catenă să prezinte o extensie compatibilă cu capătul corespunzător produs în vector de către enzima *Eco* RI, iar cel 5' de pe cealaltă catenă să aibă extensia corespunzătoare restricției cu *Bam* HI. De asemenea, s-a prevăzut ca înaintea capătului amino al peptidului somatostatina să existe codonul de start pentru metionină, pe când capătul carboxil al hormonului să fie urmat de doi codoni nonsens, de terminare.

Pe baza considerentelor enunțate, sinteza genei pentru somatostatina s-a realizat din opt „blocuri” diferite, cu lungimi de 11–16 baze, legate apoi cu ADN ligază. În final, simpla amestecare a celor două catene deja sintetizate a produs autoasamblarea moleculei prin punți de hidrogen. După tratarea cu enzimele de restricție menționate s-au introdus capetele coezive, necesare inserției pasagerului în vectorul adecvat, derivat de la plasmida *pBR322*, înzestrată cu elementele operonului *lacZ*; molecula vectorului a fost mărită cu un fragment care a introdus două noi situsuri pentru *Eco* RI. Din plasmida rezultată *pBH10* a fost construită o alta *pBH20*, prin păstrarea unui singur situs de restricție cu *Eco* RI, cel aflat lângă gena *Tc^r*. La rândul ei, plasmida *pBH20* a fost prelucrată prin hidroliză cu *Eco* RI și *Bam* HI; s-au obținut două fragmente, din care a fost reținut și purificat cel mare, legat apoi sub acțiunea ADN ligazei la gena somatostatinei, sintetizată chimic. Plasmida recombinată *pSomI* a fost folosită pentru transformarea unei gazde bacteriene, recombinații fiind selecționați pe mediu cu X-gal. Coloniile albe apărute au fost supuse screening-ului, pentru verificarea inserării pasagerului care codifică pentru somatostatina în orientarea corectă. S-a constatat că, deși plasmida era prezentă în bacterie, în cultura celulară nu a putut fi identificat produsul de exprimare. Insuccesul a dus la îmbunătățirea parametrilor plasmidei, în care scop ea a fost prelucrată mai departe, obținându-se derivatul *pSomII-3*; acesta a permis exprimarea genei sintetice, în bacteria gazdă reușindu-se evidențierea prezenței somatostatinei prin teste radioimunologice (RIA), sub 10 μg hormon/16 μg proteină bacteriană. S-a atins un randament cuprins în domeniul 0,001–0,03%. Teoretic, cantitatea de hormon poate ajunge chiar la 3%, așa că îmbunătățirea tehnologiei a dat valori superioare. Schematic, producerea pentru prima oară a unei proteine funcționale pornind de la o genă sintetizată chimic este prezentată în fig. 64.

Exprimarea genei somatostatinei în *E. coli*, sub controlul unui promotor foarte puternic, a dus la majorarea cantității de hormon la 8–15% din proteina bacteriană totală. Aceasta înseamnă că, într-un singur ciclu de fermentație (500 l; 7–9 ore), prin tehnologia ADN recombinat rezultă 10–15 g pastă bacteriană, din care se izolează 125–160 mg hormon pur. Pentru aceeași cantitate ar fi nevoie de circa 12 000 de cadavre! Faptul constituie unul dintre cele mai spectaculoase rezultate ale manipulărilor genetice.

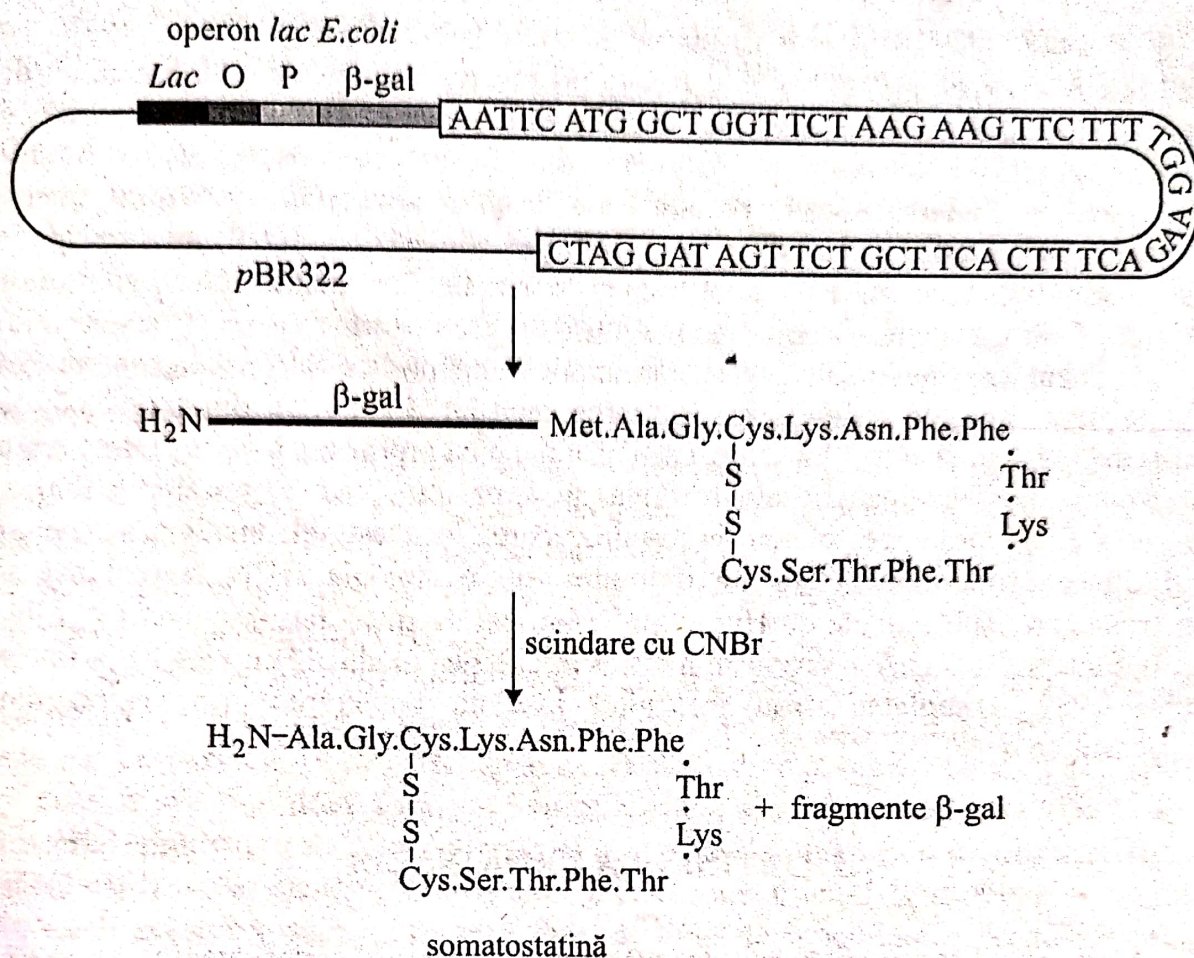


Fig. 64 – Construcția plasmidei conținând gena somatostatinei sintetizată chimic.

Trebuie menționat că o strategie similară a fost utilizată ulterior și la construirea genelor pentru insulină de către Crea și colab.(1978). În acest caz, sinteza ADN recombinat a ridicat alte probleme, ținând cont că hormonul respectiv este format din două lanțuri polipeptidice.

7.2. OBTINEREA INSULINEI

Insulina, indiferent de sursa de izolare, este un hormon polipeptidic, format din două lanțuri de aminoacizi A și B, deși în ansamblu ea constituie produsul unei singure gene: precursorul insulinei este un polipeptid denumit proinsulină, în care catenele A și B sunt legate între ele prin oligopeptidul C și având, față de proinsulină, 20 de aminoacizi în plus la capătul -NH₂. Deficiența insulelor Langerhans din pancreas de a produce cantități suficiente de insulină duce la apariția diabetului *mellitus*, subiecții afectați fiind dependenți în proporție de 20% de injecțiile cu insulină. Sursele tradiționale de hormon pentru tratamentul uman sunt de origine bovină sau, mai ales, porcină. Dar hormonul uman diferă de cel al speciilor animale (prin trei, respectiv un aminoacid).

În 1977, Ullrich și colab., iar un an mai târziu Crea și colab. (1978) au construit ADN recombinanți în care pasagerul era reprezentat de gena insulinei de șobolan și, respectiv, gena insulinei umane. Cele două grupuri au folosit strategii diferite, ajungând la rezultate similare din punct de vedere al exprimării genei/genelor clonate. Astfel, grupul lui Ullrich a sintetizat gena prin revers-transcriere, pornind de la ARNm respectiv, pe când grupul lui Crea a recurs la sinteza chimică (prin metoda fosfortriesterilor) a fiecărui segment corespunzător celor două catene. Pentru clonare au fost utilizați vectori diferiți.

În cazul insulinei umane, cele două catene polipeptidice obținute separat au fost cuplate între ele prin oxidare, cu formarea punților disulfurice din moleculă; se realizează o insulină activă biologic, ceea ce a făcut ca produsul să fie acceptat pentru tratamentul persoanelor diabetice, după trecerea cu bine a testelor chimice, biochimice, imunologice, clinice corespunzătoare. În acest fel, insulina a devenit unul dintre primele medicamente obținute prin tehnologia ADN recombinat și comercializate; sub numele de Humuline® (fabricat de firma farmaceutică Ely Lilly Inc. Indianapolis, S.U.A.), produsul a intrat în practica medicală curentă de la finele anului 1982, completând sau înlocuind insulina opoterapică (provenind din pancreasul de porc).

7.3. OBȚINEREA UROKINAZEI

Urokinaza sau activatorul de plasminogen este o serinprotează, necesară activării plasminogenului, de unde și numele. Enzima este utilizată în tratamentul trombozei, dar ea se găsește în cantități reduse în fluidele fiziologice, astfel că separarea ei devine foarte costisitoare. Gena umană corespunzătoare a fost clonată în *E. coli*, cu exprimarea unor nivele ridicate de produs. Ca și alte molecule proteice străine produse în bacterii, urokinaza a precipitat împreună cu resturile de perete bacterian, de unde a putut fi extrasă cu reactivi chaotropici (uree sau clorhidrat de guanidină). Analiza produsului rezultat a arătat apariția suplimentară a unor punți disulfurice intracatenare, ca și a unei punți -S-S- intercatenare. Rearanjarea acestor legături structurale și funcționale deosebit de importante a dus la reîmpachetarea proteinei, cu creșterea spectaculoasă a activității enzimatice (de 250 de ori). Interesant de menționat că urokinaza naturală este o proteină glicozilată, celulele bacteriene neputând asigura procesarea respectivă, dar s-a constatat că, în acest caz, activitatea biologică a proteinei recombinante nu a fost afectată.

7.4. OBȚINEREA VACCINULUI ANTIHEPATITĂ B

Hepatitele sunt maladii umane cunoscute de multă vreme, dar abia în secolul XIX s-a făcut legătura între icter și suferința hepatică. Dintre tipurile de hepatită cunoscute, hepatita virală B ocupă un loc aparte, constituind o problemă

de sănătate publică de foarte mare importanță. Circa 250 de milioane de locuitori ai Terrei sunt infectați cronic cu acest virus, care face un mare număr de victime, ca urmare a unor hepatite fulminante, a unor cancere hepatocelulare primare sau a cirozei.

Cunoașterea structurii și biologiei virusului hepatitei B (VHB) a dobândit o mare importanță, mai ales după ce s-a demonstrat fără echivoc rolul său în apariția cancerului hepatic primar. VHB are o biologie particulară, întrucât singurele gazde naturale în care se poate multiplica sunt omul și primatele (cimpanzeul), iar cultivarea sa în laborator – pe culturi de celule *in vitro*, prin mijloace convenționale – nu se poate realiza. VHB este reprezentat de o particulă sferică (ϕ 40–50 nm), în centrul căreia este localizat ADN viral, circular (circa 3200 pb), bicatenar cu porțiuni monocatenare, complexat cu antigenul de „miez” (*core*) AgHBc și cu o polimerază specifică, ADN dependentă. Complexul este îmbrăcat într-un înveliș lipoproteic, din care se proiectează în exterior antigenele de suprafață, între care AgHBs – responsabil de conferirea imunității, considerat ca marker de infecție cu VHB.

Descifrarea structurii și biologiei VHB a permis trecerea la fabricarea unor vaccinuri corespunzătoare. Ca sursă de antigene s-a utilizat în mod original plasma sangvină a purtătorilor de VHB aparent sănătoși, care conține un exces de AgHBs și care se află sub două forme – una glicozilată și alta neglicozilată. De la acest material, printr-un procedeu laborios și cu un foarte lung ciclu de obținere (65 de săptămâni), s-a ajuns la realizarea unui vaccin convențional. O problemă stringentă în cazul acestui vaccin au reprezentat-o studiile de inocuitate a produsului final, pentru eliminarea eventualelor șarje care ar fi putut fi contaminate cu particule virale. În plus, prețul relativ ridicat al produsului, precum și cantitățile practic limitate de antigen (AgHBs din sânge) a făcut ca acest vaccin să nu poată fi utilizat pe scară largă.

Tehnologia ADN recombinat a oferit o variantă atractivă de preparare a materialului antigenic. S-a ales un sistem eucariot de exprimare a genei AgHBs, pentru asigurarea glicozilării posttranslaționale a polipeptidului în cauză. Întrucât se cunoștea secvența completă a genomului VHB, gena pentru AgHBs a fost clonată într-un vector adecvat, de unde a putut fi ulterior izolată și introdusă într-un vector apropiat pentru exprimare. Astfel, în vectorul de clonare genică pBR322 s-au introdus secvențele nucleotidice ale originii de replicare a plasmidei de drojdie de 2 μ , precum și cele ale promotorului alcooldehidrogenazei I (ADH I) în gena *Tc'*, provocând inactivarea ei inserțională. În acest mod s-a obținut un vector de exprimare, în care a fost inserată gena corespunzătoare AgHBs. Recombinatul a fost utilizat în continuare pentru transformarea unei tulpini de drojdie (fig. 65).

Chiar din primele încercări s-a constatat că 200 ml de cultură de drojdie au produs 2–5 μ g AgHBs. Studiile pe animale de experiență au arătat că ele au dezvoltat un titru ridicat de anticorpi la inocularea cu antigenul viral produs neconvențional, ceea ce a atestat că proteina produsă în drojdie, sub formă liberă, nefuzionată, este îndeajuns de imunogenă ca să poată constitui baza pentru

producerea unui vaccin antiVHB. În plus, absența totală a unor posibile contaminări cu virusul ca atare și/sau cu diferite proteine umane, a permis ca în timp să fie pus la punct un vaccin eficient și sigur. Deja acesta este comercializat și utilizat în multe țări, între care și România, protejând împotriva infecției cu VHB, cu aspectele ei invalidante.

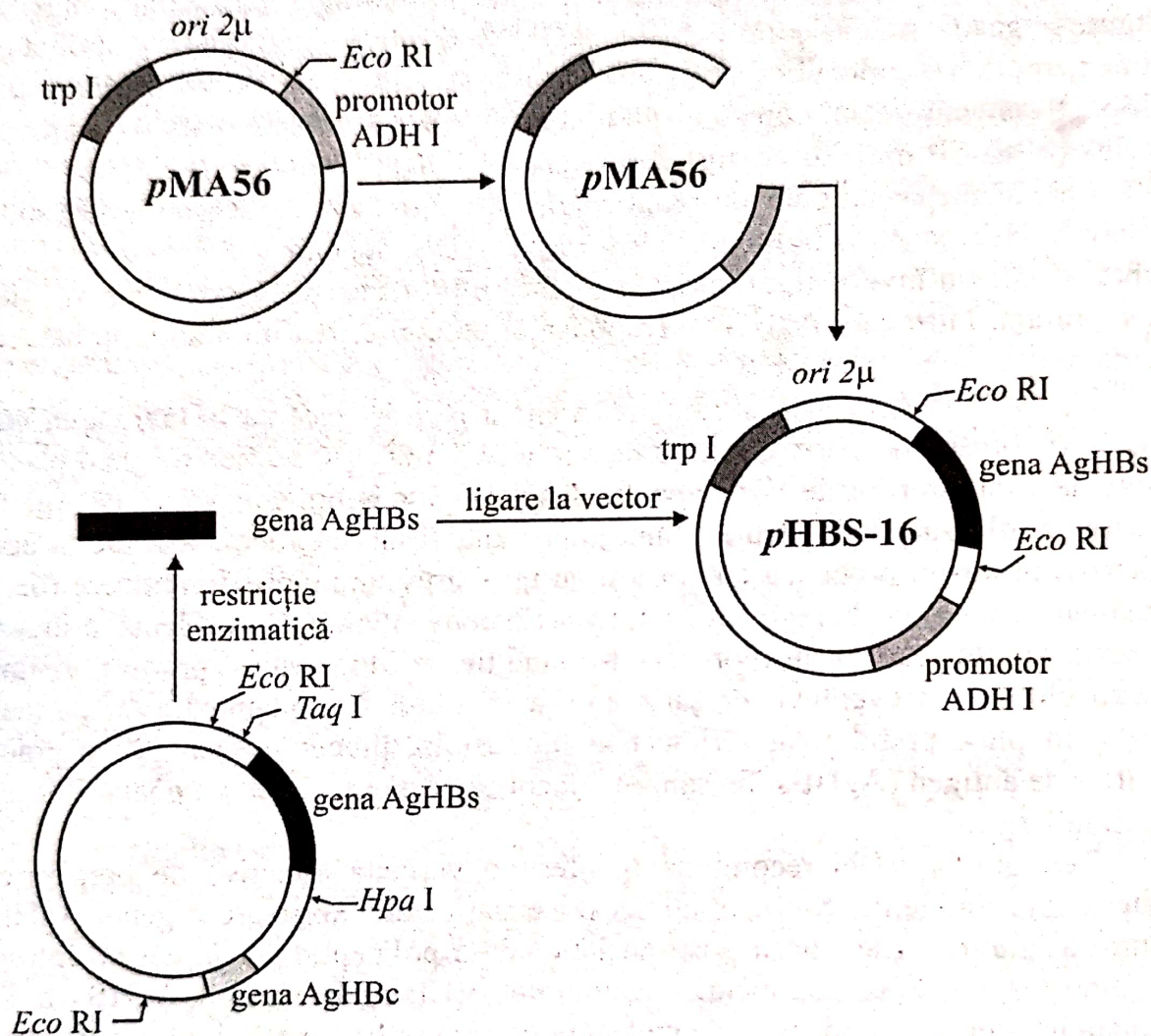


Fig. 65 – Construcția plasmidei conținând gena DgHBs.

7.5. OBTINEREA VACCINULUI ANTIRABIC

Acum 115 ani, Pasteur a preparat și folosit pentru prima oară, direct pe om, un vaccin antirabic, obținut prin emulsionarea măduvei uscate la aer, prelevate de la iepurii infectați cu virus rabic. Se știe că, la om, vaccinarea antirabică imediat după infectarea cu virus este singura cale de a împiedica instalarea bolii, cu deznodământ letal. În general, tratamentul care implică o serie de injecții, este de durată, dureros și relativ scump, uneori putând avea efecte secundare negative.

În pofida succeselor obținute în vaccinarea antirabică, în lume – iar în ultima vreme și la noi în țară, în mediul silvatic – incidența rabiei se menține relativ ridicată, ceea ce impune realizarea unui vaccin eficient, cu deplină inocuitate și cu o administrare relativ simplă. În unele țări, încercările întreprinse pentru punerea sub control a turbării au dus la unele rezultate în cazul câinilor, chiar dacă nu s-a ajuns la eradicarea infecției. Animalele sălbatice (vulpi, sconși, lilieci-vampiri etc.) aduc însă în continuare prejudicii efectivelor de animale domestice. În vederea întreruperii lanțului epidemic s-au pus la punct și s-au experimentat pe teren variante de vaccin antirabic administrabil pe cale orală, în hrană.

Pentru înțelegerea manipulărilor genetice la care s-a recurs pentru realizarea unuia dintre vaccinurile antirabice, trebuie cunoscută structura virusului. Morfologia virionilor amintește de un obuz, caracteristică ce îi face ușor de recunoscut prin microscopie electronică, cu ϕ 50–70 nm și o lungime de 170–380 nm. În interiorul „cartușului” este situată spirala nucleocapsidei, constituită dintr-o moleculă de ARN monocatenar complexat cu proteinele N și L. Această structură este, la rândul ei, protejată de proteinele de membrană M1 și M2. La exterior, se află un înveliș lipoproteic, din care sunt proiectate în afară lanțurile glicoproteinei G. Prin studii asupra proprietăților antigenice și imunogene ale acestei componente s-a arătat că ea este capabilă să protejeze animalele vaccinate, adică s-a stabilit că anticorpii antiglicoproteină rabică G pot neutraliza virusul rabic infectant.

Data fiind această situație, o posibilitate de realizare a vaccinului ar putea-o reprezenta însăși utilizarea subunității în cauză, obținută din particula virală disruptă cu detergenți. O altă cale elegantă de preparare a glicoproteinei G o constituie procedeele tehnologiei de clonare a genelor. Cunoscându-se structura genei s-a „proiectat” o moleculă capabilă să asigure exprimarea de proteină G în cantități suficiente. Într-unul din experimentele întreprinse în acest scop, autorii au ales pentru clonare și exprimare genică un vector derivat de la virusul vaccinal. Acesta prezintă o serie de avantaje, deja descrise în capitolul respectiv (v. acolo); dimensiunea mare a genomului viral, care permite inserarea unui pasager cu masă moleculară mare; existența unor semnale cunoscute de reglare a transcrierii și, fapt deloc neglijabil, păstrarea chiar și după o prelucrare parțială – a capacității infectante (nu patogene!) pentru o varietate largă de gazde eucariote.

În principiu, s-a procedat astfel (fig. 66).

ADNc corespunzător genei glicoproteinei rabice G – sintetizat prin reverstranscriere – a fost inserat într-o plasmidă conținând promotorul unei gene vaccinale timpurii. Gena himeră astfel creată are startul pentru transcrierea ARN suprapus cu codonul de inițiere a translației polipeptidului rabic, pentru evitarea producerii unei proteine de fuziune. După construirea plasmidei, s-a trecut la transfecția unor celule deja infectate cu virus vaccinal, ceea ce a dat naștere unui virus vaccinal recombinat, în care gena glicoproteinei G s-a regăsit inserată în gena timidinkinazei (utilizată ca marker de selecție). În acest mod a fost obținut virusul recombinat V-RGleu8, denumit așa întrucât în poziția 8 a capătului $-NH_2$ se găsește un rest de leucină. Testele efectuate au arătat că proteina obținută nu prezintă configurația nativă necesară pentru a fi imunogenă, majoritatea antigenului fiind

detectat în citoplasmă și nu pe suprafața celulelor, așa cum este caracteristic pentru proteina G. De aceea, s-a procedat la înlocuirea codonului pentru leucină cu cel pentru prolină, realizându-se astfel o nouă plasmidă. Cu aceasta au fost transfectate alte celule infectate cu virus vaccinal și s-a format un nou virus recombinat, denumit V-RGpro8. De această dată, cea mai mare parte a proteinei rabice G a fost regăsită pe suprafața celulelor producătoare, reacționând și cu anticorpii monoclonali antiG, la fel ca și proteina G nativă.

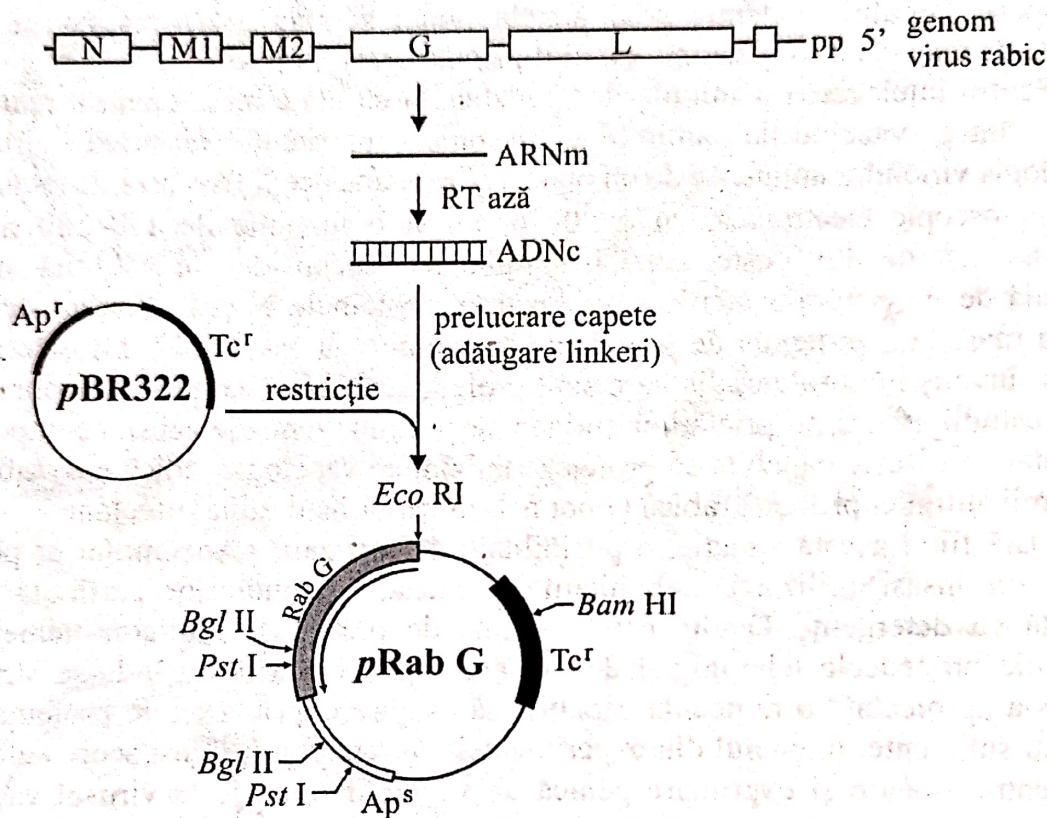


Fig. 66 – Construcția plasmidei conținând gena glicoproteinei rabice G.

Inocularea animalelor de laborator (iepurii, șoareci) cu V-RGpro8 a avut drept rezultat inducerea rapidă de anticorpi neutralizanți. Iepurii vaccinați au rezistat cu succes unei inoculări intracerebrale cu o doză severă de virus rabic virulent, spre deosebire de cei nevaccinați care au făcut boala și au murit. Comparatia între titrul de anticorpi neutralizanți după o singură inoculare cu virus recombinat a arătat că au o concentrație sensibil mai mare decât cea înregistrată după administrarea repetată a unui vaccin antirabic inactivat, de uz curent în acel moment.

7.6. TERAPIA GENICĂ UMANĂ

Până la un punct, studiile de terapie genică sunt strâns legate de cele de embriologie umană, care au fost până nu de mult blocate, atât din considerente financiare, cât și din motive etice și deontologice. De la apariția sa în 1975,

Comitetul de Avizare pentru ADN recombinat RAC (*Recombinant DNA Advisory Committee*) al S.U.A., ca oficiu al N.I.H. (*National Health Institute*) a propus discuții publice deschise asupra produselor terapeutice și asupra protocoalelor de utilizare, în special în domeniul terapiei genice. În general, în S.U.A. – unde s-a ajuns la trialuri de anvergură în clinică – se urmează o cale bine stabilită: aprobarea FDA (*Food & Drug Administration*), apoi a RAC, se alege pacienții în funcție de stadiul bolii și se optează pentru un anumit sistem de vehiculare a genelor.

În 1994, în Statele Unite, s-a reunit un consiliu *ad hoc* de 19 specialiști, care au prelucrat mai bine de 30 000 de comentarii asupra acestei probleme de mare interes. S-a considerat că pot avea loc studiile de preimplantare a embrionilor umani, care constau din clustere multicelulare cu vârstă sub 14 zile și fără un sistem nervos definit, fără să urmărească modificarea liniei germinale. S-au analizat acele domenii în care studiile se pot desfășura în beneficiul speciei umane. În aparență, conceptul terapiei genice este de o mare simplitate: se consideră o maladie în care se manifestă anormal o singură genă moștenită, pacientului respectiv urmând a i se „administra” în loc aceeași genă normală. Detaliile din această schemă redusă la esență sunt cele care determină de fapt tactica și strategia în fiecare maladie în parte. Un raport al NIH din 1995 arăta că „... pe când așteptările și promisiunile terapiei genice sunt mari, eficiența clinică nu a fost pe deplin demonstrată în cadrul nici unui protocol, în pofida declarațiilor... Majoritatea dificultăților se referă la deficiențele prezentate de toți vectorii de transfer și, parțial, din înțelegerea inadecvată a interacțiunilor biologice ale acestora cu gazda”. Deci, este vorba de identificarea unei/unor secvențe ADN apropiate și a unor celulă-țintă adecvate, urmată de stabilirea unor căi corespunzătoare pentru introducerea unei cantități suficiente de ADN specific în celulele selectate. Domeniul terapiei genice a fost extins de la tratamentul bolilor genice propriu-zise și de la încetinirea progresiei tumorilor până la lupta împotriva maladiilor virale sau la stoparea afecțiunilor neurodegenerative.

Și totuși, terapia genică – apărută ca atare acum 10–15 ani – s-a dezvoltat treptat, de la conceptul de introducere a unei gene pentru compensarea celei defective, până la cunoașterea mai bună a naturii transgenei și a exprimării sale, a persistenței, a toxicității și a proprietăților sale imunologice. În prezent, accentul se pune pe îmbunătățirea sistemului de administrare a genelor, în încercarea de depășire a fazei empirice. Deși până în acest moment, în lume s-au realizat câteva sute de trialuri clinice, pe un număr relativ mare de pacienți, încă nu există concluzii definitive în ceea ce privește protocoalele de urmat. Deocamdată, terapia genică s-a adresat numai celulelor somatice, esențial nereproductive, dar alegerea acestora depinde de natura bolii considerate. De exemplu, a fost identificată gena ale cărei defecte provoacă apariția fibrozei chistice; pentru suplinirea funcțiilor sale s-a pus la punct un protocol de introducere în plămâni a ADN „corect”, sub formă de aerosoli (Crystal, 1995). Sau – alt caz – cel al defectelor procesului de coagulare sangvină, cum ar fi hemofilia, care impune atingerea în plasmă a unui nivel terapeutic ridicat de

proteine cu rol coagulant; de data aceasta, s-a presupus că celulele musculare sau cele hepatice, fibroblastele sau chiar celulele sangvine ar putea asigura biosinteza proteinei respective, dacă acceptă ADN corespunzător (Saint Louis și Verma, 1988; Dai și colab., 1992). Alegerea țesutului în care să se exprime proteina terapeutică depinde de o serie de factori, cum ar fi eficiența „eliberării” genei, modificările moleculei proteice, statusul imunologic, accesibilitatea și costul.

De asemenea, trebuie luată în considerare cantitatea de proteină terapeutică de care este nevoie. Astfel, hemofilia B este provocată de deficiența factorului IX, care atinge doar 5% din nivelul normal (de $5\mu\text{g/ml}$ plasmă, produs de 10^{13} celule hepatice, ceea ce înseamnă că ar trebui corectată gena corespunzătoare la cel puțin 5×10^{11} celule). Pe de altă parte, dacă unui număr mult mai mic de celule i s-ar putea transfera mai multe gene (eventual în tandem), s-ar putea atinge nivelul necesar de proteină fără a se aduce prejudicii organismului.

În 1980 s-a făcut o încercare – nereușită – de introducere a unei gene pentru tratarea talasemiei, cu ajutorul tehnicii clasice de transfer de ADN mediat de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Apoi, pe modele animale, s-a imaginat transferul de gene utilizând vectori retrovirali. De la animale s-a trecut la om. Primul transfer clinic de gene a avut loc în Statele Unite, pe baza unui protocol aprobat oficial de către FDA (*Food and Drug Association*) și de către RAC, la 22 mai 1989, și s-a referit la o genă-marker. Primul tratament genic, aprobat de către aceleași foruri, s-a petrecut tot în S.U.A. și a început la 14 septembrie 1990.

Transferul genic efectuat la nivelul câtorva sute de celule cerebrale ar putea constitui un beneficiu considerabil pentru pacienții cu deficiențe neurologice. Dar, cea mai importantă realizare ar fi transferul genic în celulele stem (progenitoare), care cresc și se divid, asigurând milioane de celule teoretic identice.

„Călcâiul lui Achile” în această terapie îl reprezintă atât inserarea genelor corectoare, cât și eficiența de realizare a acestora. Pentru transport se folosesc fie vectori nonvirali (pornind chiar de la injectarea ADN „nud” până la amestecarea acidului nucleic cu polilizină sau cu lipide cationice, dar eficiența lor este de multe ori scăzută sau exprimarea este tranzitorie), fie – mai ales – vectori virali. Aceștia dispun de mecanisme specifice de pătrundere în celulă, dar în acest caz se ridică problema posibilului răspuns imun.

Deși domeniul se află la început, mulți cred că terapia genică va schimba radical tratamentul multor maladii. Una dintre cele mai surprinzătoare aplicații ale progreselor realizate în biologia moleculară o constituie utilizarea virusurilor în terapia genică. Întrucât virusurile folosesc mașinăria de sinteză a celulelor pe care le infectează în scopul propriei multiplicări, ele pot servi și pentru a oferi organismelor suferinde (în special umane) genele de care au nevoie. Sunt în curs numeroase studii care să asigure că virusurile „terapeutice” (adică vectorii virali purtători ai genelor de interes) ajung la și afectează exclusiv celulele-țintă, unde sunt exprimate în mod adecvat.

În general, pentru terapia genică umană se face apel la vectori derivați din genoame virale, atât ADN, cât și ARN, fiecare sistem prezentând anumite avantaje, dar și limite de utilizare. Se lucrează cu vectori virali non-replicativi, cum ar fi:

– **vectori retrovirali** – care asigură doar transducția celulelor replicative; ei permit ca dimensiunea transgenei să fie de circa 8,5 kb, iar recombinatul să se insereze – aleatoriu – în genomul celulei gazdă. Prin manipularea genomului, unele gene virale nocive pot fi înlocuite cu transgene – cum ar fi cea pentru factorul IX, a cărui exprimare se va afla fie sub controlul LTR virale, fie sub cel al unor elemente *enhancer*-promotor, „inginerizate” concomitent cu transgena. Genomul-himeră rezultat se introduce în celule de împachetare, care vor sintetiza toate proteinele virale, dar separate față de LTR și de secvențele de împachetare. În acest fel, vor fi asamblate doar genoamele virale-himeră, generând vectorul retroviral. Mediul de cultură în care au fost cultivate celulele de împachetare se pune în contact cu celulele-țintă, realizându-se transferul de gene. Circa 10^6 celule-țintă pot fi infectate cu 1 ml cultură virală. Limita critică a vectorilor retrovirali este reprezentată de incapacitatea lor de a infecta celulele care nu se divid, cum ar fi cele musculare, cerebrale, pulmonare, hepatice. De aceea, de la potențialul pacient se prelevează țesut/celule-țintă, care se cultivă *in vitro*, se infectează cu vectorul viral recombinat și se reimplantează donorului. Procedul a fost numit de terapie *ex vivo*. Dacă pentru exprimarea genei de interes în vector se introduce un promotor puternic, cum ar fi cel din virusul citomegalic, atunci există șanse de păstrare a unei concentrații ridicate de proteină.

Încercările făcute pe model animal, unde s-a lucrat cu populații *inbred*, nu pot fi „translate” la oameni (populații *outbred*), cu mari variații individuale care atrag un înalt grad de complexitate în problema transferului de gene, cu o mare capacitate de exprimare. În plus, vectorul recombinat se integrează aleator în ADN cromozomal, putând provoca activarea oncogenelor sau, dimpotrivă, inactivarea genelor celulare tumorosupresoare, chiar dacă probabilitatea producerii unui astfel de eveniment este scăzută.

Tot familiei *Retroviridae* aparțin și lentivirusurile, cel mai cunoscut membru fiind virusul imunodeficienței umane dobândite (HIV). Lor le este caracteristică posibilitatea de a infecta inclusiv celule care nu se divid (Lewis și colab., 1992). Prin prelucrarea genomului viral respectiv (deletarea genelor *gag*, *pol*, *env*, dar și *tat*, *rev*, *vpr*, *vpn*, *nef*, *vif*) a fost dezvoltat un vector pentru transferul de gene *in vivo*, cu transgena inclusă între LTR și secvențele de împachetare (Naldini și colab., 1996). Dacă în designul vectorului se păstrează gena *env*, se creează un instrument capabil să infecteze exclusiv celulele care exprimă antigenul $CD4^+$; de obicei, gena *env* a HIV este înlocuită, eventual cu gena corespunzătoare a virusului stomatitei veziculare. Se pot atinge astfel titruri de vector de circa 10^9 /ml. După inocularea creierului, ficatului, mușchiului de rozătoare cu acești vectori s-a obținut o exprimare bună timp de circa 6 luni, moleculele recombinat respective oferind perspective interesante în domeniu;

– **vectori adenovirali** – care formează recombinanți conținând alogene de până la 8,5 kb și transduc celule nonreplicative; nu se integrează și dau răspuns inflamator. Adenovirusurile infectează și celule care se divid, și celule care nu se divid, producând mai ales afecțiuni respiratorii. Celulele infectate *in vivo* cu adenovirus recombinat pot exprima alogenele cu caracter terapeutic, dar – deoarece din construcția lui au fost deletate gene virale esențiale pentru replicare – nivelul scade dramatic la 5–10 zile postinfecție. Totuși, dacă vectorul a fost introdus la șoareci nuzi sau la unii căroră li s-a administrat un tratament imunosupresor, s-a realizat o exprimare pe termen lung. Vectorii adenovirali dau un răspuns imun puternic, atât la nivel umoral, cât și la nivel celular. Cei mai mulți indivizi umani au anticorpi antiadeno, ceea ce nu este încurajator pentru utilizarea acestui tip de vectori. Deoarece celulele-țintă ar putea conține factori care să declanșeze sinteza de proteine adenovirale, s-a realizat o nouă generație de vectori adenovirali, al căror nivel ridicat de exprimare se păstrează mai multă vreme, înregistrându-se un declin după 20–85 de zile (Chen și colab., 1997). Utilizarea acestui tip de vectori devine deosebit de interesantă dacă se urmărește exprimarea alogenei pe termen scurt. În acest caz, mai multe molecule de vector adenoviral recombinat, conținând gene pentru enzime care pot activa omorârea celulelor sau gene imunomodulatoare, vor fi inoculate la nivelul unor tumori. Răspunsul celular imun față de proteinele virale va provoca liza celulară;

– **vectori derivați de la virusuri herpetice** – adecvați pentru terapia sistemului nervos central au la bază virusuri replicative etc.

S-au făcut încercări de transfer de gene și utilizând sisteme nonvirale, cum ar fi ADN plasmidial sau lipozomii, dar s-a observat o eficiență de transducție scăzută, iar în cazul lipozomilor chiar diferențe dependente de formula lipidelor constitutive. Pornind de la această constatare, că țintirea genei „corectoare” într-o populație specifică de celule reprezintă momentul critic în realizarea terapiei genice, s-a continuat căutarea unui sistem ideal de orientare, eficient și de maximă acuratețe. Așa după cum s-a menționat, vectorii retrovirali s-au dovedit ineficienți și nonspecifici pentru eliberare de gene în celulele hematopoietice. S-a descris în schimb un sistem care conține un vector conjugat la un ligand ce poate ținti specific receptori de pe suprafața celulelor de interes. Această metodă de transfer de gene utilizează un mecanism de endocitoză mediat. S-a folosit SCF (*stem cell factor*) în conjuncție cu un kit destinat legării la receptori. Celulele stem hematopoietice sunt candidați de elecție pentru tratamentul bolilor genice specifice; ele exprimă pe suprafață un receptor pentru SCF, cunoscut ca *c-kit*. Un vector adenoviral conjugat cu polilizină a fost incubat cu ADN recombinat (conținând gena de interes) conjugat – la rândul său – cu polilizină și streptavidină. PoliLys se leagă electrostatic de ADN, adenovirusul incompetent replicativ previne degradarea ADN de interes în lizozomi, iar streptavidina se leagă la proteinele celulare biotinilate. Incubarea cu SCF biotinilat are drept rezultat formarea unui complex molecular, capabil de țintirea specifică a celulelor hematopoietice progenitoare care exprimă *c-kit* (fig. 67).

Prezența moleculelor de streptavidină oferă sistemului versatilitate, căci SCF biotinitat poate fi înlocuit și cu alți liganzi marcați în același mod. Sistemul și-a dovedit calitățile în studiile întreprinse pentru receptorii transferinei sau ai asialoorosomucoidului de pe hepatocite.

Trecerea la studiile clinice necesită corecta alegere a celulelor-țintă. De asemenea, trebuie avută în vedere dimensiunea genei de exprimat în funcție de vector și definirea unor obiective clare (reversia bolii, cu vindecare sau doar ameliorarea stării de sănătate, cu o progresie lentă a maladiei).

Aplicațiile terapiei genice sunt în domeniul cancerului, al maladiilor monogenice (cum ar fi deficiența de adenozindeaminază ADA, fibroza chistică, hipercolesterolemia ereditară etc.) sau al maladiilor dobândite (infecția cu HIV, artrita reumatoidă etc.).

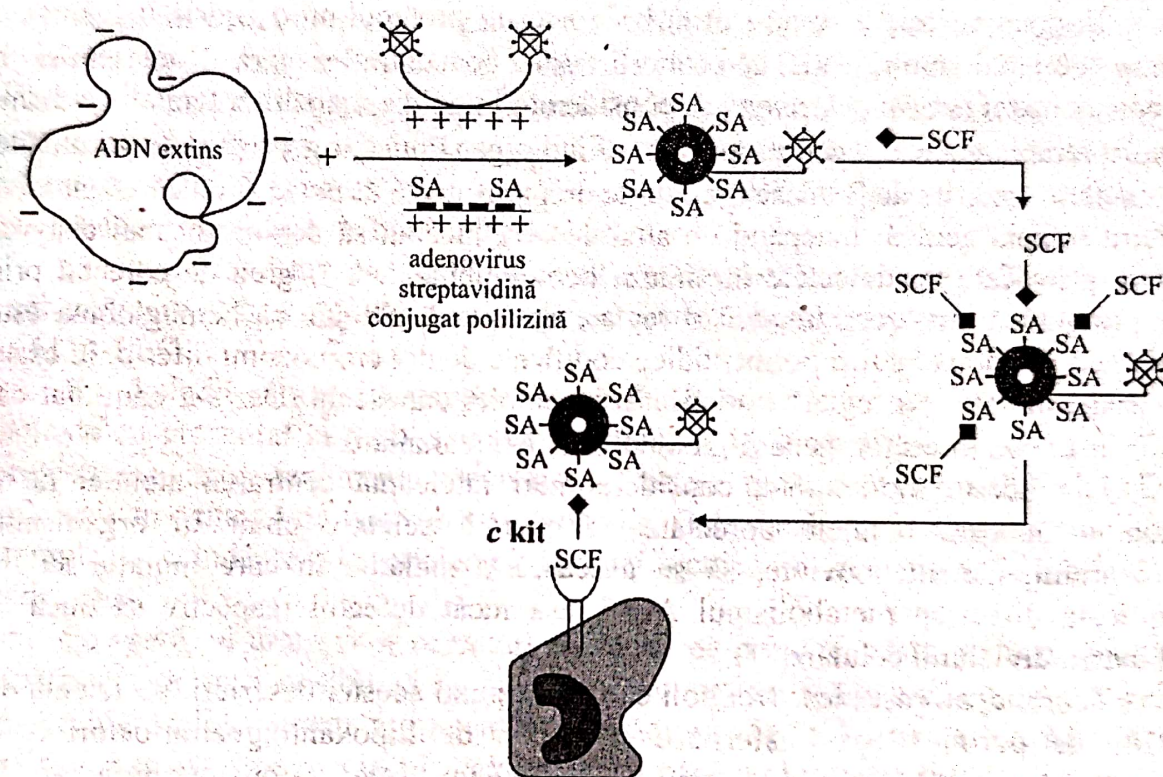


Fig. 67 – Metodă de introducere a ADN recombinat în celule eucariote.

Astfel, în cazul unui pacient care prezenta o deficiență parțială de ornitintrascarbamilază (OTC) Gelsinger, s-au administrat 6×10^{11} particule recombinante/kg corp (cea mai mare cantitate permisă în protocoalele de teste clinice), particulele fiind reprezentate de un adenovirus cu genele E1/E4 deletate și având integrată în locul lor gena OTC. Se pare însă că fiecare produs terapeutic are limita sa de suportabilitate, iar cea dată subiectului de mai sus a fost una prea mare. Pe de altă parte, vectorii adenovirali – așa după cum s-a menționat – conferă doar o exprimare tranzitorie, iar OTC este o enzimă-cheie în ciclul ureogenetic, necesară pe parcursul întregii vieți. Se ridică două întrebări: este vectorul adecvat pentru terapia genică de acest tip? administrarea în rapel a produsului nu ar putea declanșa o „rejectare” imunologică a virusului? Oricum, pacientul nu supraviețuiește.

Schemele de tratament puse la punct au obiective științifice și clinice, au ridicat probleme etice și sociale.

7.6.1. TERAPIA ADA

A urmărit două obiective: cel clinic, de posibilă evaluare a eficienței terapeutice a administrării de limfocite autoloage transduse cu gena umană ADA (adenozindeaminază) pentru reconstituirea funcției celulare și a sistemului imun umoral la pacienți cu o imunodeficiență gravă combinată cu defectul ADA. Obiectivul științific a fost reprezentat de evaluarea supraviețuirii *in vivo* a celulelor T autologe cultivate *in vitro* și durata de exprimare a genelor inserate.

Raționamentele care au stat la baza acestui protocol au o istorie îndelungată. Timp de mai mulți ani, cercetătorii s-au concentrat asupra β -talasemiei și drepanocitozei (*sickle cell anemia*), considerate inițial ca maladii potențial candidate pentru terapia genică. S-a presupus că – fiind o genă mică – gena β -globinei umane, mutantă în cazurile de β -talasemie sau de drepanocitoză, ar putea fi un candidat ideal pentru terapia genică. Începând cu anul 1984 a început să devină tot mai clar că bolile provocate de defectele în sinteza hemoglobinei vor fi greu de corectat prin terapie genică, deoarece implică o reglare complexă. Se știe că hemoglobina este compusă din două lanțuri polipeptidice codificate de doi cromozomi diferiți, în exact aceeași cantitate - o reglare sofisticată, incomplet cunoscută. Dar s-a constatat că, după inserarea în vector, gena β -globinei suferă o rearanjare.

Din aceste motive, s-a considerat mai înțeleaptă centrarea atenției pe o maladie în care celulele corectate să crească selectiv chiar în organismul pacientului. Cu alte cuvinte, să se găsească o maladie în care mutația să fie implicată direct în metabolismul ADN, așa încât defectul respectiv să ducă la inhibarea diviziunii celulare.

Teoretic, au fost alese trei boli care corespund acestei descrieri: deficiența de ADA, de purinnucleozidfosforilază (PNP) și de hipoxantinguaninfosforibozil-transferază (HGPRT) sau sindromul Lesch-Nyham. Cele trei enzime deficitare în bolile enumerate catalizează etape secvențiale ale metabolismului purinic. Dintre ele, deficiența ADA a putut fi tratată și printr-un transplant de măduvă osoasă, așa cum se practica prin anii 1975–80. S-a dovedit astfel că celulele T-ADA normale au rol terapeutic și că în timp ele pot înlocui celulele T-ADA deficitare. În final, pentru tratament, în locul celulelor T autoloage s-a preferat măduva osoasă, ale cărei celule au fost supuse transducției.

Terapia prevedea ca, o dată pe lună, pacientul să fie supus leucoforezei, apoi celulele mononucleare să fie izolate în gradient de Ficoll și crescute în cultură, în condiții în care celulele T să fie activate cu interleukină-2 (IL-2), fitohemaglutinină și anticorpi monoclonali OKT3. După diviziune, celulele urmau să fie incubate cu un vector retroviral LASN (cu gena ADA normală și cu markerul Neo^r), se continua creșterea *in vitro* pentru alte câteva zile, iar apoi se proceda la reinjectarea

pacientului. Deoarece creșterea unor mari cantități de celule T pe timp îndelungat în cultură *in vitro* are ca risc o predominanță oligoclonală, s-a optat pentru probe mici, crescute pe perioade scurte.

Protocolul a fost aplicat în septembrie 1990, unei fete de 4 ani, care a primit intravenos o doză din propriile sale limfocite T, corectate genic. În momentul începerii noii scheme de tratament, pacienta fusese deja supusă timp de doi ani unui tratament de înlocuire a ADA, conjugată cu PEG (polietilenglicol), care a dat rezultate convenabile doar în primul an. Tratamentul genic a constat în șapte transfuzii la 1–2 luni, împreună cu injecții săptămânale cu ADA-PEG. Întrucât după 10 luni circa 20–25% din celulele T circulante conțineau ADA normală - fapt dovedit prin PCR, iar rezistența la infecții a subiectului crescuse considerabil, tratamentul nu a mai continuat pentru 7 luni, fiind apoi reluat doar ca transfuzii de întreținere, la 5 luni interval. La vârsta de 8 ani, copilul Ashanti da Silva a prezentat o stare de sănătate bună. În anul 2000, ea se afla la adolescență, ducea o viață normală, urmând o școală obișnuită și doar faptul că sub monitorizare fiind, trebuie din când în când să mai suporte – la intervale de timp mari – „corectarea” genei defecte amintește de boala de care suferă.

Un alt caz, o fetiță de 9 ani, a început tratamentul în ianuarie 1991 și a urmat o schemă care utiliza celule T autoloage corectate genic, ca și injecții săptămânale cu ADA-PEG.

S-a dovedit că această terapie este utilă din punct de vedere clinic. Ambele paciente au prezentat în timp o evidentă îmbunătățire a stării lor de sănătate, fără înregistrarea unor fenomene secundare. Trebuie menționat că celule T-ADA deficitare au o durată de viață de 30–35 de zile. Cele două cazuri amintite sunt doar exemple concludente ale eficienței terapiei genice în acest tip de deficiență enzimatică.

Se speră, în urma unor cercetări efectuate pe primate, că în anumite condiții experimentale ar fi posibil să fie transduse cu vectori retrovirali conținând gena ADA chiar celulele-stem totipotente din măduva osoasă, ceea ce ar permite ca enzima să se exprime pe viață în celulele T ale pacientului tratat genic.

Alte scheme de tratament au implicat folosirea unui amestec de celule T autoloage, corectate pentru gena ADA deficitară, cu celule de măduvă osoasă de la progenitor. În acest caz, s-au folosit doi vectori retrovirali diferiți, pentru a se putea urmări traseul și viața lor în organismul supus intervenției.

7.6.2. TERAPIA GENICĂ ÎN CANCER

După aprobare, în 1989 a fost inițiat un experiment de transfer al unor celule imune marcate genetic la pacienți având cancer în stadii avansate. Protocolul a avut două obiective primare:

- demonstrarea faptului că genele exogene pot fi transferate în siguranță pacienților;

– demonstrarea faptului că gena transferată poate fi detectată după un anumit interval de timp în celulele prelevate de la pacient.

De altfel, terapia genică în cancer ridică o serie de întrebări, cu răspunsuri intricate, legate de:

– calea de administrare, *ex vivo* sau *in vivo* (inoculare directă sau sistemică);
– natura celulelor-țintă (celulele tumorale sau celulele efectoare ale gazdei; alegerea celor din urmă ar obliga sistemul imun să identifice ținta și să amplifice răspunsul, având drept urmare o simplificare a inoculării sistemice a vectorilor);

– necesitatea transducerii fiecărei celule tumorale sau a unui număr redus dintre acestea; problema este în interrelație și cu tipul bolii de tratat – locală sau diseminată;

– scopul intervenției: corecția unui defect al celulei tumorale, corectabil prin terapie antisens, sau acțiunea letală asupra celulei neoplazice, prin activarea sistemului imun al gazdei sau prin administrarea unui prodrug (ca în cazul utilizării genei TK HSV1).

În fiecare din aceste cazuri, rolul vectorului este același, de a intermedia „eliberarea” genei de interes sau a elementelor celulare reglatoare în celula specifică (Blaese și colab., 1995).

Încercările de terapie genică în cancer au pornit de la protocolul de tratament al melanomului malign avansat, cu limfocite care se infiltrează în tumori (TIL – *tumor infiltrating lymphocytes*) în mod specific. Aceste limfocite sunt celule T izolate direct din tumori și care pot fi crescute foarte bine în culturi, în prezența IL-2, ca factor de creștere specific. Circa 2×10^{11} TIL pot fi ulterior administrate la pacienți pe cale intravenoasă, împreună cu IL-2, în mai multe reprize zilnice. Acestui tratament i-au răspuns 35–40% din pacienți. Dar restul de 55–70%? Ce se întâmplă după 6–12 luni? S-a constatat că numai un subset celular din populația heteroloagă de celule T sunt eficiente antitumoral *in vivo* și s-a pus problema care anume. Deoarece ^{111}In , folosit de obicei în marcarea TIL, are $T_{1/2} = 2,8$ zile, s-a propus pentru marcarea o genă de rezistență la antibiotice. În acest scop, unei alicote de celule TIL proaspete și tinere i s-a transferat gena Neo^r de la *E. coli* cu ajutorul unui vector retroviral; celulele „înginerizate” au fost crescute apoi împreună cu cele nemarcate și introduse la pacient. Probe de sânge și biopsii periodice au arătat dacă și câte celule au fost prezente în circuitul sangvin și în tumoare, încercându-se o corelație între prezența TIL marcate și răspunsul clinic. Nu s-au observat complicații datorate genei transferate, iar detecția genei a putut fi realizată – în funcție de individ – după săptămâni sau chiar după 1–2 luni. Unul dintre acești primi pacienți fost considerat vindecat.

Primul protocol de terapie genică în boala neoplazică a derivat direct din cel de introducere a genei marker pentru neomicină (Neo^r) în TIL. După ce s-a demonstrat că TIL modificat genic nu induce alterări ale stării generale a pacienților implicați, s-a inițiat un protocol în care unui vector i s-a inserat gena pentru TNF (*tumor necrosis factor*). Obiectivul era creșterea eficienței TIL împotriva melanomului malign în faze avansate.

TNF ca atare este un puternic agent antitumoral. Introducându-se gena pentru TNF în TIL și apoi țintind TIL către celulele tumorale, s-ar putea atinge doze mai mari de TNF chiar la nivelul tumorii, evitându-se astfel efectele sistemice colaterale. Deoarece cea mai mare parte a TIL este captată și probabil distrusă de ficat, splină, plămâni, iar producția de TNF din gena exogenă se află sub controlul unui promotor heterolog, apare totuși riscul unei sinteze crescute de TNF cu efecte toxice nedorite. Acest risc potențial a făcut ca prima fază a cercetării să fie consacrată determinărilor care să stabilească dacă în ficat sau în alte organe apar concentrații toxice de TNF.

La pacienții supuși tratamentului de mai sus nu au fost înregistrate efecte secundare ca urmare a transferului genei străine, dar se pare că este totuși prematur să se aprecieze dacă procedeul este cu adevărat inocuu.

Există cel puțin două căi majore de a ameliora imunoterapia cu TIL prin transferul de gene: fie să se adauge gene patrimoniului genetic al celulelor TIL sau celulelor T pentru a le determina o activitate crescută, fie să se introducă genele dorite direct în celulele tumorale pentru a obliga sistemul imunitar al pacientului să crească activitatea TIL.

S-au elaborat scheme de tratament în care gena TNF a fost inserată în celulele tumorale izolate de la un pacient și crescute în cultură. În aceste experimente s-a extrapolat experiența de la animale, unde s-a dovedit că inocularea cu celule tumorale transduse cu gene ale unor citokine produce o imunitate sistemică antitumorală mediată de celulele T. În aceste scheme, celulele tumorale secretoare de citokine autoloage au fost injectate subcutan și intradermic la pacienți. După 25 de zile, s-au recoltat ganglionii limfatici, care au fost plasați în cultură, pentru stimularea creșterii celulelor T. Acestea au fost apoi inoculate unui pacient cu celule având gena IL-2. În acest fel, s-au produs „vaccinuri tumorale”, cu rezultate încurajatoare.

Deocamdată, tratamentul tumorilor cu diseminare multiplă într-un anumit organ (creier sau ficat) rămâne paleativ. Pentru îmbunătățirea schemelor terapeutice s-a recurs la utilizarea ca agenți antitumorali a virusurilor oncolitice, atât pe modele experimentale, cât și în cercetările clinice. Aceste virusuri au fost folosite la construirea de vectori de terapie genică, pentru transferul unor gene cu efect anticanceros (gena p53 săbatic etc.).

Astfel, transducția pe cale arterială a tumorilor singenice de șobolan 9L, din creierul unor animale imunocompetente, cu un vector derivat de la HSV1 a avut loc după disruperea farmacologică a barierei hematoencefalice. Tehnica rămâne relativ inefficientă, deoarece vectorul poate fi eliminat printr-un răspuns antiHSV1 substanțial, posibil de contracarat prin tratarea cu ciclofosfamidă (care suprimă răspunsul antiviral înăscut).

Au mai fost propuse numeroase alte scheme de terapie genică. Astfel, pentru tratarea pacienților suferind de hipercolesterolemie familială s-a încercat inserarea genei receptorului pentru o lipoproteină de densitate joasă (*low density lipoprotein*) în hepatocite. Aceste celule, corectate genic, urmau să fie injectate pe cale portală la pacient.

În China s-a pus la punct, la un moment dat, o schemă pentru tratamentul hemofiliei B. În acest caz, s-a construit un vector retroviral cu gena factorului IX de coagulare sangvină, iar recombinatul a fost utilizat pentru transducția unor fibroblaste autoloage de piele în cultură de celule. Ulterior, ele urmau a fi reinjectate subcutan pacientului. Experimentul a început în 1991.

La un moment dat, inventarul experimentelor de terapie genică cuprindea datele din tabelul 11.

Tabelul 11

Scheme de terapie genică

Schemă	Institut	Maladie	Debut experiment
<i>Gene marker</i>			
NeoR/TIL	Bethesda (S.U.A.),	melanom malign	1989/1991
NeoR/măduvă osoasă	Lyon (Franța)	leucemie acută juvenilă	1991
NeoR/hepatocite	Memphis (S.U.A.) Houston (S.U.A.)	hepatopatii	
<i>Terapie genică</i>			
ADA/celule T periferice	Bethesda (S.U.A.)	deficiență ADA/SCID (severe combined immunodeficiency)	1990
Ada/celule T periferice + măduvă osoasă de la progenitor	Milano (Italia)	deficiență ADA/SCID	1992
TNF/celule tumorale factor IX/fibroblaste piele autoloage	Bethesda (S.U.A.) Shanghai (China)	cancer avansat hemofilie B	1992 1992
HSV TK/celule cancer ovarian	Rochester (S.U.A.)	cancer ovarian	
HSV TK/limfocite T citotoxice	Seattle (S.U.A.)	SIDA	

Cu toate insuccesele înregistrate de-a lungul timpului în studiile clinice de terapie genică, ultimele rezultate ale unor trialuri dau mari speranțe. Astfel, au fost raportate cazurile a patru pacienți cu imunodeficiență severă X-linkată (SCID), provocată de deficiența receptorului γ al citokinei hematopoietice. Acești pacienți au fost tratați cu propriile lor celule de măduvă osoasă CD34-pozitive, transduse cu un retrovirus conținând gena pentru lanțul γ , în final constatându-se restabilirea răspunsului imun.

S-a afirmat că pentru ameliorarea protocoalelor de terapie genică este nevoie nu numai de o mai profundă înțelegere a mecanismelor de bază în maladiile monogenice, ci și de stabilirea a diferite căi de abordare, așa după cum a fost

nevoie de diferite clase de medicamente pentru tratamentul diferitelor boli. Astfel, două trialuri clinice (faza I) efectuate la ASH (*American Society for Hematology*) ilustrează foarte bine acest aspect. Într-un trial SCID, pacienților le-au fost reimplantate celule proprii de măduvă osoasă infectate *in vitro* cu un vector retroviral. În cel de al doilea trial, pacienților cu hemofilie B li s-a inoculat intramuscular un vector de tip adenoviral asociat (AAV), purtător al ADNc pentru gena factorului IX de coagulare. Deși este relativ dificil de atins titruri suficient de înalte de AAV, pentru a se putea observa un beneficiu clinic, a fost ales acest vector și nu unul retroviral, deoarece pacienții selectați erau infectați HIV și se aflau sub terapie cu antiretrovirale.

De menționat că în nici unul din aceste două trialuri nu au fost înregistrate efecte secundare. Experimentele au fost derulate în speranța punerii la punct a unor terapii genice standard.

De asemenea, a fost relatat rezultatul fazei I a unui trial efectuat pe subiecți cu hemofilie B, datorită deficienței factorului IX de coagulare. După 11 săptămâni de tratament, la doi din cei trei pacienți cărora li s-a administrat un recombinat (vector derivat de la AAV, conținând ADNc pentru gena factorului IX) a fost detectată proteina respectivă. La aceiași indivizi, timp de 4–5 săptămâni, s-a constatat o necesitate redusă pentru administrarea de factor IX exogen.

În cadrul terapiei genice s-au efectuat numeroase studii atât pe modele animale, cât și în trialuri clinice privind „terapia cu gene sinucigăse”, laitmotivul acesteia fiind utilizarea genei timidinkinazei virusului herpes simplex 1 (TK HSV1), prin intermediul unor vectori retroviral sau adenoviral (incompetent în replicare) pentru tratamentul unor tumori, mai ales cerebrale (glioame) (Lyons și colab., 1995). După infectarea celulelor tumorale cu vectorii corespunzători recombinati, se aplică tratament cu Gancyclovir, care omoară predilect doar celulele transduse, deși s-a constatat și un *bystander effect* la celulele din proximitate.

Dewey și colab. (1999) au studiat efectele „sinuciderii” mediate de un adenovirus recombinat asupra unui model pe SNC de șobolan, care prezintă aspecte comune cu creșterea infiltrativă a tumorilor gliale umane. Tratamentul acestor tumori cu o singură doză de Adv/HSV-1-TK, urmată de administrarea Gancyclovir, a indus o inflamație cronică, detectabilă și peste 3 luni. Deși tumoarea a fost eliminată, efectul inflamator a persistat, observându-se și demielinizarea în zona fostei tumori, ceea ce ridică probleme legate de acest tip de terapie. Cercetările ulterioare trebuie să aprofundeze mecanismele apariției efectelor secundare, în vederea excluderii sau diminuării lor.

Green fluorescent protein (GFP) constituie un marker eficient pentru aprecierea integrării unei secvențe ADN într-o celulă. Eficiența transfecției poate fi apreciată și celulele modificate pot fi sortate prin flow citometrie pentru fluorescența GFP. Gena acestei proteine poate fuziona cu o genă sau cu un promotor țesut-specific, ceea ce permite monitorizarea expresiei la animalele transgenice, în funcție de stimulul utilizat. Cercetările de ultimă oră s-au focalizat pe folosirea GFP în decelarea tumorilor sau a țesuturilor afectate atât la animale,

cât mai ales la pacienți umani. Această proteină fluorescentă ajută la marcarea celulelor afectate, pentru distrugerea lor ținută prin microchirurgie laser sau pentru aprecierea gradului de invazivitate, prin tomografie de emisie pozitronică (PET), endoscopie sau alte tehnici imagistice.

Pentru utilizarea în imunizări au fost propuse picornavirusurile, deși instabilitatea lor genetică poate avea repercusiuni asupra profilaxiei. Totuși, s-a demonstrat expresia crescută, precum și stabilitatea insertului folosind o nouă strategie în designul vectorului, cu îndepărtarea parțială a secvențelor reglatoare necodificatoare cu secvențe corespunzătoare insertului.

7.7. PLANTE TRANSGENICE

Cea mai mare parte a hranei populației globale este asigurată – direct sau indirect – de către cereale, a căror recoltă poate fi afectată de numeroși factori fizici (fenomene meteorologice) sau biologici (atacul dăunătorilor). Tehnologiile tradiționale de cultivare a plantelor au fost treptat înlocuite de tehnologii moderne de selecție a unor soiuri cu randamente superioare, iar în ultima vreme există tendința de introducere a organismelor modificate genetic (OMG) vegetale, cu rezistență crescută la factorii de mediu, cu posibilitatea de a-și fixa singure azotul atmosferic (ceea ce ar duce la eliminarea îngrășămintelor chimice) etc. „Inginerizarea” plantelor prin tehnologia ADN recombinat urmărește creșterea adaptabilității la condițiile de mediu și climatice, ridicarea randamentului în producția unor cereale bine echilibrate din punct de vedere nutrițional, inducerea rezistenței intrinseci la ierbicide, insecticide, paraziți, virusuri.

În mod obișnuit, încrucișarea soiurilor de plante se realizează prin combinarea *tuturor* genelor pe care le au cele două sau mai multe specii parentale, etapă urmată de programe care să ducă la selecția combinațiilor utile/dorite. Tehnologia ADN recombinat aplicată la plante are drept scop introducerea *unei singure* gene, cu simplificarea obținerii unor soiuri noi. În general, nivelul ridicat de exprimare a unei gene specifice ar trebui să fie avantajos. Acest deziderat poate fi atins prin creșterea numărului de copii ale genei date/celulă. Este ceea ce se urmărește mai ales în cazul genelor pentru proteinele de rezervă din plante. În plus, unele proteine vegetale sunt sărace în anumiți aminoacizi esențiali, așa încât îmbogățirea în lizină sau triptofan poate fi un obiectiv pentru modificările genetice ale plantelor. În acest scop, gena izolată pentru o proteină dată este prelucrată pentru îmbunătățirea compoziției în aminoacizi, iar apoi reintrodusă în planta de origine. Regiunile de control a acestor gene trebuie și ele să fie manipulate pentru a permite exprimarea genei modificate în diverse țesuturi, în frunze sau în semințe. Un exemplu este dat de faseolină, proteina de rezervă (25–50%) din *Phaseolus vulgaris*. Vectori bazați pe plasmida Ti au reușit să asigure transferul genei faseolinei la *Nicotiana tabacum*. Inițial, expresia genei a fost la nivel scăzut și nu s-a supus nici unui proces de reglare. Progenii acestor plante ajunse adulte au

prezentat o sinteză scăzută de faseolină în frunze și în tulpină, dar una ridicată în semințe. Acest fapt a demonstrat că există atât reglaje genice țesut-specifice, cât și reglaje proprii etapelor de dezvoltare a plantelor la trecerea de la o specie (fasolea) la alta (tutunul), gene care pot fi apoi moștenite stabil în sisteme heteroloage.

Pe de altă parte, identificarea unor markeri moleculari va permite o mai ușoară detecție și selecție a progenilor rezultați prin tehnologia ADN recombinat. De altfel, aceste gene marker pot fi ligate în tandem chiar la gena de interes. Plantele reprezintă sisteme deosebit de complexe, relativ dificil de manipulat. Un obstacol major îl constituie chiar introducerea și menținerea stabilă a unei alogene într-o anumită plantă. În acest scop pot fi utilizate trei sisteme :

- infecția cu *Agrobacterium tumefaciens* (teoretic, poate fi folosită doar pentru plantele dicotiledonate);
- captarea directă de ADN alogen;
- infecția cu virusul mozaicului conopidei (CaMV) sau cu alte virusuri ale plantelor, modificate pentru a deveni vectori.

Interesant de menționat modul în care se preconizează introducerea rapidă de gene străine la plante: ca vector a fost propus ADNc corespunzător genomului virusului piticirii roșiei, în care a fost introdus promotorul 35S al unui caulimovirus și ribozimul antigenomic provenit de la virusul hepatitei δ , împreună semnalul de poliadenilare a genei pentru nopalinsintază (Scholthof, 1999).

Cerealele sunt plante monocotiledonate, așa încât s-a pus problema găsirii unor vectori adecvați pentru manipularea lor. S-a constatat că și în cazul lor există posibilitatea transformării: câteva specii de monocotiledonate (*Asparagus*, *Clorophytum*, *Narcissus*) au fost infectate la locul rănirii cu *A. tumefaciens*, iar apoi s-a observat exprimarea genei specifice pentru nopalinsintază ADN-T specifică. O metodă îmbunătățită pentru infectarea cu succes a monocotiledonatelor cu *A. tumefaciens* a fost sugerată de identificarea unor molecule semnal „de rănire” 4-acetil- și 4-(2-hidroxiacetil)-2,6-dimetoxifenol, care par a avea rolul de atragere a bacteriei la locul traumatismului, acționând ca inductori ai genelor *vir*. În acest fel, tratarea plantelor cu moleculele semnal ar putea constitui un procedeu pentru transferul de gene, mediat de plasmida Ti.

O cale mult mai promițătoare este cea a transferului direct de gene, prin captarea și integrarea ADN în celulele vegetale, după tratarea protoplașilor (celule vegetale al căror perete celulozic a fost îndepărtat) cu produsul adecvat. Regenerarea plantei integrale din protoplaștii transformați ridică însă o serie de probleme, dar – în același timp – a dus la obținerea de succese notabile, cum ar fi introducerea genei pentru neomicinofosfotransferază (care conferă rezistență la antibioticul geneticină G418) în gramineele (monocotiledonate) *Lolium multiflorum* și *Triticum monococcum*.

Tot în domeniul vegetal, o problemă de prim ordin o reprezintă distrugerea buruienilor, fără afectarea plantelor de cultură, ceea ce la ora actulă se rezolvă cu ajutorul ierbicidelor. Administrarea lor trebuie făcută în anumite momente de dezvoltare a dăunătorilor, prin aplicare directă, sau absorbția și/sau metabolizarea

lor să fie diferită la planta de cultură față de buruieni. Enzimele din calea de biosinteză a aminoacizilor pot fi ținte de elecție pentru designul inhibitorilor specifici, care pot juca rolul ierbicidelor. Astfel, ingineria genică oferă posibilitatea de introducere a unor gene de rezistență la ierbicide în plantele de cultură, care nu vor fi afectate de tratamentele respective. Spre exemplu, din *Salmonella typhimurium* s-a izolat gena pentru rezistența enzimei 5-enol-piruvil-shikimat-3-fosfatsintazei (sau 3-fosfoshikimat-1-carboxiviniltransferazei) la glifosat (ierbicide). Această enzimă catalizează conversia fosfoenolpiruvatului și a shikimat-3-fosfatului la 5-enolpiruvatshikimat-3-fosfat și este ținta pentru glifosat, care blochează biosinteza aminoacizilor aromatici. Enzima rezistentă conține un singur aminoacid modificat și anume Ser în loc de Pro (poziția 101), ceea ce are drept urmare o scăzută afinitate pentru glifosat. Secvența genei *aroA*, care codifică această enzimă rezistentă, a fost clonată în ADN-T a *Agrobacterium rhizogenes* (care induce mai degrabă formarea de rădăcini păroase decât de tumori *crown gall*). Din rondele de frunze de tutun, expuse la acțiunea bacteriei purtătoare a plasmidei recombinante, au fost regenerate plante rezistente la glifosat. Experimentul a deschis perspectiva introducerii genei respective de rezistență, dar și a altora, la alte plante de interes economic.

O țintă alternativă pentru inducerea rezistenței la ierbicide a fost oferită de studiile asupra microorganismului fotosintetizator *Anacystis nidulans*. Gena *psbA* codifică proteina Q, existentă și în cloroplaste unde acționează ca acceptor de electroni într-un anumit sistem fotosintetic. Mutația care înlocuiește Ala 264 cu Ser conferă rezistență la mai multe ierbicide, chiar din clase diferite.

Protejarea plantelor față de insectele dăunătoare se poate face și prin pulverizarea de preparate deshidratate de *Bacillus thuringiensis*, conținând o toxină. S-a pus și problema stabilirii unor relații pseudo-simbiotice între bacterie și organismul vegetal, ceea ce ar însemna colonizarea rădăcinilor plantei cu bacterii capabile să exprime toxina, ucigătoare a larvelor. Dar abordarea cea mai penetrantă a constatat în modificarea directă a plantei. S-a constatat că *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* produce cel puțin patru toxine în plus față de alte subspecii, active contra a numeroase specii de diptere (între care și țânțarii) și lepidoptere. Gena pentru proteina toxinei majore a fost deja clonată și introdusă la plantele de tutun, cu ajutorul sistemului de transformare oferit de *Agrobacterium*. Plantele respective au exprimat toxina, fiind protejate la atacul insectelor. Ca urmare a succesului obținut, vor putea fi inginerizate pentru protecția antiinsecte dăunătoare și alte specii vegetale cu valoare economică, în funcție de reglementările legale în vigoare în fiecare țară.

De mare interes este și problema fixării azotului atmosferic de către plante, prin reducere biologică. Plantele superioare au nevoie de îngrășăminte chimice de sinteză, produse de o industrie energofagă și poluantă. Procesul biologic este limitat la un număr redus de microorganisme, care se află în relații de simbioză cu puține plante de valoare economică (leguminoase). Capacitatea acestora de a fixa azotul se datorează prezenței unor nodozități radiculare conținând bacterii din familia *Rhizobiaceae*, care posedă un sistem enzimatic specializat. Sistemul *nif* a

fost intens studiat, mai ales la *Klebsiella pneumoniae*, care nu are relevanță pentru agricultură, dar care prezintă similarități structurale și funcționale cu sistemele *nif* ale *Rhizobiaceae*. În general, ansamblul genelor fixatoare de azot este deosebit de complex: există 17 gene aflate într-o regiune cromozomală de 23 kpb.

Genele *nifH*, *nifD*, *nifK* codifică lanțurile polipeptidice Kp1 și Kp2 ale nitrogenazei, iar alte gene exprimă oxidoreductazele implicate în transferul de electroni și funcțiile de sechestrare a molibdenului și de sinteză a cofactorilor care îl conțin. De asemenea, există gene care reglează procesul, cum ar fi *ntr*, nelegate genetic de *nif*, dar responsabile de reglarea celulară a metabolismului azotului. În absența unor relații simbiotice, plantele verzi nu pot fixa azotul atmosferic. Un obstacol major în stabilirea fixării azotului la acest nivel constă în incompatibilitatea dintre extrema sensibilitate a nitrogenazei la oxigen și obligativitatea participării oxigenului în cursul fotosintezei. Cyanobacteriile care fixează azotul, dar sunt și organisme fotosintetice, rezolvă această contradicție fie printr-o separare temporală între evenimente, fie printr-o separare fizică (în compartimente celulare diferite sau în celule diferențiate, numite heterociști).

La cereale (grâu, porumb etc.) sau la alte plante de interes (cartof), o soluție ar putea fi deci separarea fizică a funcțiilor: sistemul *nif*, în rădăcini, și cel de fotosinteză în părțile verzi. Pentru inginerizarea speciilor agricol-valoroase în vederea fixării directe a azotului, au fost propuse două moduri de abordare a problemei:

- realizarea de simbioți, adică introducerea genelor necesare pentru producerea nodozităților și pentru infectarea cu *Rhizobium*;

- introducerea directă a genelor *nif* în plantele superioare, cea mai tentantă variantă, dar și cea mai dificilă, întrucât implică o cascadă de evenimente (inserare și exprimare corectă, procesare, asamblare, funcționare, integrare în lanțul metabolic propriu noii gazde a genelor *nif*). Exprimarea genelor într-un mod bine coordonat de către mașinăria transcripțională și translațională a plantelor reclamă o modificare intensivă a secvențelor de reglaj: promotorii procarioti sunt diferiți de cei eucarioti, iar cei de la plante sunt relativ puțin cunoscuți și descifrați. Or, anterior ca genele *nif* transferate de la bacterii la plante superioare să fie active, trebuie înlocuiți promotorii bacterieni cu promotorii adecvați. De asemenea, trebuie ca localizarea subcelulară pentru exprimarea genelor *nif* să fie una corespunzătoare, celulele radiculare constituind o țintă de elecție. Pentru transfer au mai fost propuse și cloroplastele, întrucât transformarea mediată de *Agrobacterium* permite inserția în aceste organite. În plus, la acest nivel, există ioni de fier și molibden (necesari sintezei de cofactori), precum și enzime pentru reducerea N_2 la NH_3 . De asemenea, sunt prezente sisteme de generare a ATP, furnizorul de energie în procesul de reducere. Totuși sarcina manipulării genelor *nif* este dificilă.

În Marea Britanie, un raport privind implicațiile OMG folosite în alimentație asupra stării de sănătate a populației a ajuns la următoarea concluzie: „nu există dovezi concludente care să indice că tehnologiile de utilizare a OMG

în obținerea de produse destinate hranei sunt inerent dăunătoare”. De altfel, în unele țări precum S.U.A., populația consumă astfel de alimente, iar pentru viitor se pune problema unor studii comparative, în funcție de regiuni, grupe, țări, față de martori convenabili.

În România, pentru evitarea potențialelor consecințe ale consumului de OMG a fost creată Comisia Națională de Securitate Biologică, având rol consultativ în domeniu. Ministerul Apelor, Pădurilor și Mediului a elaborat legea 214/2002, care interzice comercializarea OMG.

7.8. ANIMALE TRANSGENICE

De peste 100 de ani, animalele – ca atare sau în sisteme care presupun doar derivate ale acestora – au fost folosite extensiv în studii biomedicale și farmacologice de laborator, ca modele pentru mai buna cunoaștere a funcțiilor și disfuncțiilor organismului uman. Deși în timp s-au propus din ce în ce mai multe teste *in vitro*, animalele nu pot fi total înlocuite, deoarece ele sunt sisteme anatomice și fiziologice complexe, acționând în condiții normale sau patologice. Mai mult, în ultimii 15 ani se pune un accent din ce în ce mai pronunțat pe realizarea animalelor-himeră, transgenice, prezentând un mare interes atât pentru cercetare, cât și din punct de vedere economic. În general, prin *organism-himeră* se înțelege un organism ale cărui celule derivă din doi sau mai mulți zigoți. Himerele pot fi:

- indivizi născuți din fuziunea a doi (sau mai mulți) embrioni cu genotipuri diferite;
- indivizi produși prin agregarea embrionilor în perioada de clivaj;
- indivizi produși prin injectarea unui ADN străin în cavitatea unui blastocist.

La sfârșitul anului 1982, două grupe de cercetători americani, conduse de Palmiter și, respectiv, de Brinster, anunțau că au reușit să obțină „șoareci uriași”, ca urmare a injectării genei hormonului de creștere a șobolanului în ovulele de șoarece proaspăt fecundate. Șoarecii rezultați, care erau de două ori mai grei decât cei „normali”, au devenit astfel primele *animale transgenice*, adică animale care au înglobat în patrimoniul lor ereditar o genă provenind de la o altă specie, pe care au transmis-o descendenților. Ulterior, experimentul a fost reluat, cu rezultate similare, folosindu-se gena hormonului uman de creștere.

De fapt, primele animale purtătoare de gene străine introduse experimental au fost tot șoarecii, cărora li se inoculase prin microinjectie în cavitatea blastocitară ADN SV40, regăsit apoi în unele țesuturi somatice. Anterior dezvoltării tehnologiei ADN recombinat, singura sursă majoră de gene pure au constituit-o virusurile. Într-un studiu de început, privind introducerea ADN străin în embrionii de șoarece, ADN SV40 pur a fost microinjectat în blastociștii embrionilor. Blastociștii tratați au fost reimplantați în uterul unor șoricioaice mame-purtătoare, iar în final 40% din progeni au avut în celulele lor ADN SV40. Șoarecii respectivi au fost „mozaicați”:

în fiecare țesut individual câteva celule au conținut ADN viral. Atunci (1974) nu s-a putut demonstra integrarea informației genetice străine în linia germinală, dar ulterior, aceiași autori (Jaenisch și colab., 1977) au depășit acest obstacol, în cadrul studiilor privind infectarea embrionilor cu virusul leucemiei Moloney, care a avut drept rezultat generarea primei linii de șoareci transgenici. S-a dovedit astfel că un ADN străin se poate integra și apoi se poate menține în proliferarea și diferențierea celulelor în țesuturile adulte.

Introducerea unor gene în linia germinală a mamiferelor este una dintre cuceririle tehnologice majore în biologie. De la un simplu exercițiu de laborator, obținerea animalelor transgenice a devenit un mijloc de studiu în biologia modernă (pentru descifrarea reglării genice pe parcursul dezvoltării, a mecanismele de acțiune a oncogenelor, a funcționării sistemului imunitar, a dezvoltării mamiferelor etc.) Pe această bază s-au realizat deja modele animale ale unor boli genetice umane sau producători animali pe scară largă de proteine cu importanță economică.

Descoperirea faptului că elementele acționând în *cis*, în interiorul sau în apropierea genelor, conferă specificitate de țesut, și asigură reglarea în procesul de dezvoltare constituie contribuții majore la înțelegerea funcționării diferențiate a genelor; s-a realizat investigarea reglării genelor sistemului imunitar, studiul proceselor maligne, crearea unor modele în terapia genică, precum și crearea unor modele ale maladiilor genetice, ca și designul unor strategii în ingineria genică.

7.8.1. METODE DE INTRODUCERE A GENELOR STRĂINE LA ANIMALE

Caracteristicile diferite ale celor trei protocoale de transfer genic pe animal le fac utilizabile în diverse grade în studiul expresiei genice și în mutagenizația inserțională. Diversele strategii de realizare a animalelor transgenice sunt sintetizate în tabelul 12:

Tabelul 12

Strategii de obținere a animalelor transgenice

Metodă	Avantaje	Dezavantaje
Microinjecție	– tehnică relativ simplă, nivel ridicat de exprimare transgenică; utilizată foarte des.	– rearanjamente semnificative ale genomului gazdei, pe baza integrării unor concatemi mari.
Infecție cu retrovirusuri	– cea mai simplă tehnică, ADN proviral fiind perfect adaptat pentru clonarea unor mutații inserționale.	– exprimare redusă, limitarea dimensiunilor ADN pasager (heterolog).
CES	– poate selecta între exprimare sau mutație, anterior trecerii pe animal.	– cea mai dificilă din punct de vedere tehnic, iar transmiterea pe cale germinală poate sau nu să aibă loc.

7.8.1.1. Microinjecția ADN în pronucleul unui ovul de șoarece fecundat a fost cea mai răspândită și cea mai eficientă metodă de obținere a șoarecilor transgenici. Ea a permis integrarea stabilă în genomul gazdei a mai multor

molecule de ADN străin, aranjate cap-la-coadă. Se pare că anterior integrării, moleculele de ADN se asociază prin recombinare omoloagă, iar ulterior tandemul se inserează într-un singur situs de pe cromozom. S-a lansat chiar ipoteza că acesta ar putea fi reprezentat de unele rupe aleatorii, posibil provocate de către enzimele de reparare induse de capetele libere ale ADN injectat (Brinster și colab., 1985). Ca urmare a integrării, s-au semnalat rearanjări, deleții, duplicări, translocări de material genetic.

Nu întotdeauna ADN se inserează în genomul gazdei. De exemplu, ADN din papilomavirusul bovin fie se integrează stabil în genomul șoarecilor transgenici, fie se menține în stare epizomală, dar în ambele cazuri el se poate transmite la urmași, fără ca mecanismele procesului să fie pe de-a-ntregul descifrate.

Imediat după fecundarea ovocitului se formează un nucleu (cunoscut ca *pronucleu*) prin fuziunea cu capul spermatozoidului; în acest stadiu de scurtă durată (la șoareci este de câteva ore), genoamele parentale sunt încă separate fizic. Principalul avantaj al microinjectării directe a ADN recombinat în pronucleu este eficiența generării unor linii transgenice, în care majoritatea genelor se exprimă într-o manieră predictibilă. Dezavantajul constă în imposibilitatea introducerii genelor în celule aflate în stadii tardive de dezvoltare. Mai mult, clonarea situsurilor inserțiilor cromozomale ar putea fi dificilă din cauza copiilor multiple și/sau a rearanjamentelor secvențelor gazdei.

Mai târziu, genele (ca recombinat) au fost microinjectate în embrionii de șoarece, în stadii timpurii de diviziune. Ovulele manipulate, ajunse la termen, reprezintă doar 10–30%. În general, se microinjectează câteva sute de copii de ADN străin (fig. 68.a), iar embrionul este transferat unei mame-purtătoare. Maximum 40% dintre urmașii care apar prezintă un genom modificat, cu gena străină integrată randomizat (fără preferințe cromozomale de locație, dar de obicei în tandem la un singur locus).

Astfel, ADN microinjectat în celula embrionară primordială este integrat stabil atât în celulele somatice, cât și în linia germinativă, cu transmiterea mendeliană a caracterului dobândit. Evenimentul integrării are loc foarte devreme în dezvoltare, anterior primei diviziuni a zigotului și înainte de segregarea acestei celule primordiale. După integrare se pune problema determinării exprimării și a verificării controlului adecvat.

7.8.1.2. Infecția cu retrovirusuri. Spre deosebire de ADN microinjectat, retrovirusurile se integrează în genomul celulei-gazdă printr-un mecanism bine definit. La un situs cromozomal dat se inserează o singură copie de acid nucleic proviral, fără apariția unor rearanjamente ale genomului gazdei, având loc cel mult duplicații scurte ale secvențelor de la situsul de integrare. Embrionii de șoarece în stadiul de preimplantare pot fi expuși la stocuri concentrate de virus sau „cocultivați” pe monostraturi de celule producătoare de virus. Au fost elaborate și metode de introducere a virusului în embrioni postimplantați între 8–12 zile de

gestație. Această tehnică (fig. 68.b) asigură infecția a numeroase celule din țesuturi somatice, dar frecvența de infectare a celulelor germinale este foarte scăzută. În mod similar, atunci când embrionii de găină au fost expuși în stadiul de blastocist la acțiunea virusului leucemiei aviare, infecția celulelor germinale a fost practic nulă. Deoarece pronucleul de pui nu poate fi microinjectat cu ADN, infecția cu retrovirusuri constituie calea de elecție în obținerea unor pui transgenici.

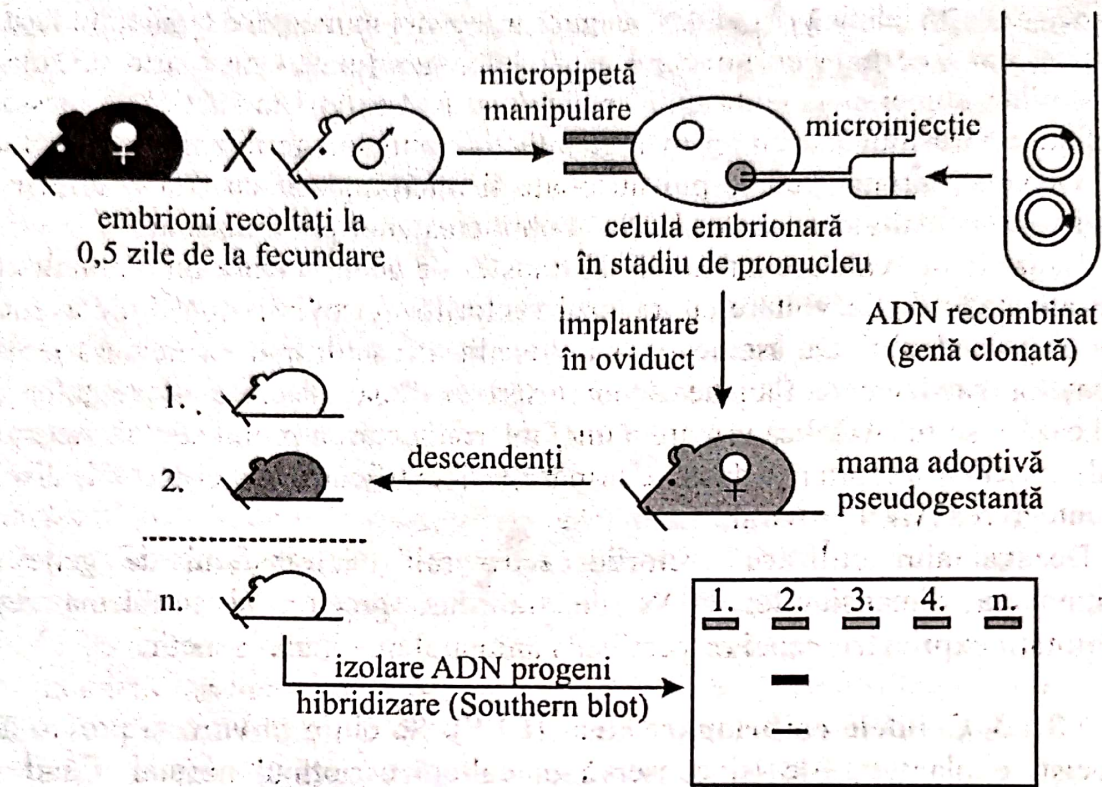
Ușurința de realizare a tehnicii de transfer de gene la embrioni animali aflați în variate stadii de dezvoltare cu ajutorul vectorilor retrovirali constituie avantajul major al procedurii. De asemenea, s-a dovedit a fi mult mai lesnicioasă izolarea secvențelor gazdei care flanchează un insert artificial, decât a secvențelor care flanchează insertul ADN ca urmare a unei microinjectări a pronucleului. Acest fapt este de maximă importanță dacă se urmărește identificarea genei gazdei, disruptă după integrarea ADN proviral.

Dezavantajul utilizării vectorilor retrovirali în transferul de gene este condiționarea dimensiunilor ADN de transdus, precum și problema reproductibilității exprimării genei respective la animalul manipulat genetic.

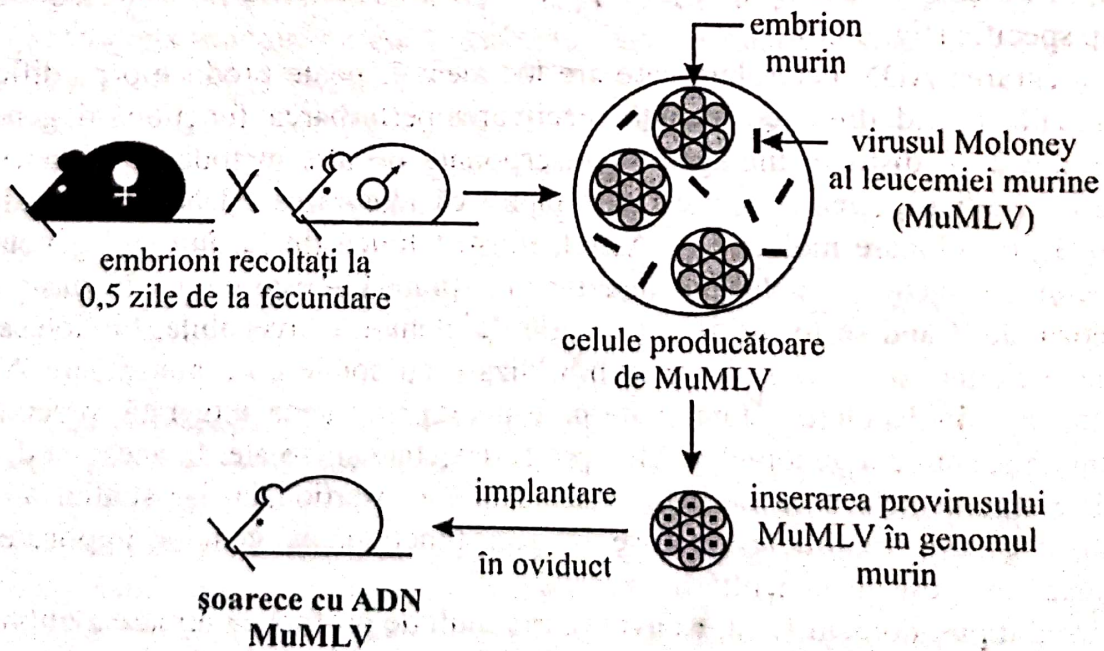
7.8.1.3. Celulele embrionare stem (CES). Se obțin *in vitro* și provin de la blastociști explantați. Ele își conservă în cultură cariotipul normal. Când sunt injectate în blastociștii gazdei, CES „colonizează” embrionii, aducându-și contribuția la linia germinală a animalului-himeră rezultat. În CES, genele de interes pot fi introduse eficient prin transfecție cu ADN sau cu ajutorul transducției mediate de retrovirusuri. Clonele celulare selectate din punct de vedere al prezenței ADN străin își mențin caracterul pluripotent. Cu ajutorul acestei tehnici s-a reușit obținerea de șoareci transgenici pornind de la clone selectate *in vitro* pentru un fenotip specific (fig. 68.c).

Integrarea ADN heterolog, care are loc aleator, poate produce o modificare inserțională, având drept consecință inactivarea/perturbarea funcționării genelor gazdei. Ceea ce distinge mutageneza inserțională de alte metode de inducere a mutațiilor (radiații, agenți chimici) este faptul că integrarea ADN străin poate fi reversată prin clonare moleculară. Astfel, într-o tehnică tipică, întregul genom al șoarecelui transgenic – incluzând inserția mutațională – este clonat în plasmide, fagi, cosmide. Când se folosește o strategie de clonare convenabilă, biblioteca de gene este supusă *screening*-ului prin hibridizare cu sonde corespunzătoare ADN microinjectat; moleculele recombinante care poartă transgena integrată, precum și porțiuni adiacente din genomul gazdei, pot fi detectate și izolate. În acest mod, pot fi izolate fragmentele de gene care susțin mutația inserțională, iar studiul lor va permite decelarea modificării induse și deci funcționarea genelor implicate în complexe procese ale dezvoltării.

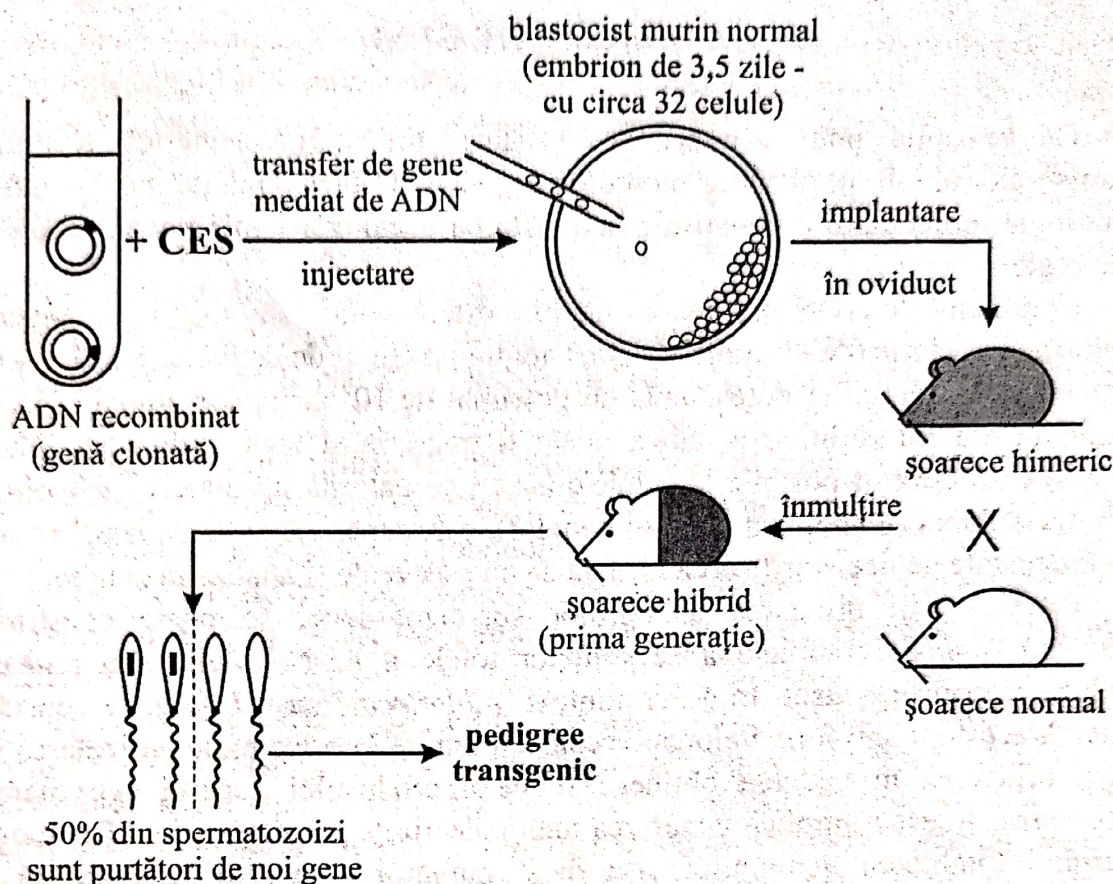
Unul dintre domeniile care a avut foarte mult de profitat ca urmare a obținerii de animale transgenice este cel al imunologiei și, în general, al reglajului și al exprimării genice.



a.



b.



c.

Fig. 68 – Căi pentru obținerea animalelor transgenice.

Institutul Roslin (Scoția) a anunțat recent nașterea unui miel la care a fost deletată una dintre copiile genei proteinei prionice PrP. Este pentru prima dată când această genă a fost deletată la alt mamifer decât șoarecele. Însă mielul *knock out* s-a dovedit a fi purtătorul unui defect cardiopulmonar netratabil, care a permis o supraviețuire de numai 12 zile.

Tot în anul 2001 a fost descrisă clonarea unui porc, folosind aceleași mijloace de transfer nuclear utilizate în cazul celebrei oi Dolly, dar cuplate cu noi abordări în ceea ce privește inducerea stării de gestație și pentru menținerea sa cinii; purcelul clonat avea 5 luni în momentul anunțării creării sale și părea să se dezvolte normal. De ultimă oră (2002), în S.U.A., a fost clonată și pisica. Lucrările de la Roslin, în colaborare cu compania Geron (California, S.U.A.), reprezintă o parte din programul de modificări genetice asupra animalelor domestice, ca aplicații ale biotehnologiei. În ceea ce o privește pe Dolly, primul animal clonat, trebuie spus că ea a fost eutanasiată la începutul lui 2003, datorită faptului că ea „născându-se” dintr-o celulă somatică de la un adult, vârsta ei biologică era mult mai mare decât cea cronologică, astfel încât a prezentat foarte timpuriu o serie de suferințe ale sistemului osos. Deocamdată a fost creat potențialul producerii prin inginerie genetică de animale cu caractere fenotipice prestabilite. Deja există „capre umanizate” sau „vacile umanizate”, care dau în lapte proteine cu proprietăți farmaco-dinamice deosebite.

7.9. BĂNCILE DE GENE

Cu excepția unor grupuri de virusuri, informația genetică a tuturor organismelor are drept purtător molecula de ADN. O problemă de maxim interes în biologia moleculară o constituie cunoașterea organizării informației și modul ei de reglare.

Conținutul de ADN per genom haploid diferă semnificativ de la organism la organism: o bacterie (de exemplu, *E. coli*) are un potențial de codificare de 3 – 4 000 produse genice; la om ar corespunde un potențial de 10^6 gene, dar numai o parte a genomului are rol codificator, adică poate fi transcris și apoi tradus. Studiile de organizare au devenit posibile la celulele eucariote datorită introducerii tehnologiei ADN recombinat (tehnologia clonării genelor), care a permis izolarea genelor sau a unor fragmente genice, purificarea lor față de alte secvențe și analiza în detaliu.

Practic, prin utilizarea achizițiilor sus-menționate, se poate construi o *biblioteca (bancă)* completă a secvențelor totale a ADN celular sau numai a genelor oricărui organism. În acest context, *biblioteca (banca)* de gene constă în existența acestora sub formă clonată, ceea ce permite în orice moment izolarea lor, pentru utilizarea în vederea obținerii finale a produsului a cărui exprimare o controlează. Aceasta implică generarea unei colecții de fragmente de ADN clonat, incluzând totalitatea genomului, așa încât numărul coloniilor rezultate să fie aproximativ egal cu cel al genelor organismului dat. Clonele se obțin prin:

- fragmentarea genomului organismului donor, cu ajutorul enzimelor de restricție (mai ales unele care recunosc situsuri de patru nucleotide, chiar dacă frecvența de 1 situs la 256 pb calculată teoretic nu este acoperită practic) sau mecanic (aleator); o bibliotecă genomică ideală ar trebui să consistă dintr-o serie de clone conținând secvențe suprapuse, reprezentative pentru totalitatea genomului în cauză;
- introducerea prin legare a fragmentelor într-un vector adecvat, adică având o mare capacitate de acceptare a genelor străine (în special, vectori fagici și cosmide, căci plasmidele admit circa 10 kDa, pe când fagii, circa 20 kDa, iar cosmidele, 40–50 kDa);
- tehnici cât mai eficiente de transformare/transfecție cu ADN recombinat a unor celule apropiate;
- metode de *screening* (succesiunea unor operații care să permită selecția secvențelor specifice de ADN recombinat).

Tehnologia ADN recombinat permite purificarea unor secvențe specifice de ADN din masa de ADN celular, ca de exemplu:

- izolarea unei secvențe ADN specifice și identificate în mare cantitate. Se face analiza de restricție, secvențializarea, corelația secvență/produs de exprimare (aminoacizi-ARNm-ADN genomic), stabilindu-se eventual intronii etc. Prin compararea structurii diferitelor gene se pot pune în evidență regiunile majore implicate în reglare, cu localizarea și definirea lor;

– analiza expresiei genice *in vitro* sau prin reintroducerea în celulă ca ADN recombinat. Aplicând mutageniza *in vitro* a ADN recombinat se poate urmări influența ei asupra controlului expresiei genice;

– exprimarea unor molecule biologice active de proteine, în scop academic sau de producție.

Înainte de a porni un experiment de clonare trebuie optat pentru:

– ADNc sau fragment de ADN genomic;

– clone ADN din produse „îmbogățite”/purificate sau din biblioteci complete; când se utilizează ADN genomic „îmbogățit” se reduce numărul total al clonelor de selecționat.

Pentru a putea fi utilizat la construcția unei biblioteci de gene, ADN izolat din organismul donor trebuie să corespundă anumitor criterii:

– să reprezinte genomul în totalitate;

– să aibă o masă moleculară mare (adică un înalt grad de polimerizare);

– să nu conțină ADN contaminant, care ar putea provoca distorsionarea rezultatelor.

De aceea, metodele de izolare trebuie să fie adecvate pentru diverse tipuri de țesut (animal sau vegetal). Numărul recombinanților obținuți după clonare depinde de dimensiunea genomului studiat, precum și de dimensiunea fragmentelor clonate. Pentru calculul numărului minim de colonii care să acopere totalitatea genomului cu o probabilitate de 99%, se folosește formula propusă de Clarke și Carbon (1976):

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln\left(1 - \frac{x}{y}\right)},$$

unde P este probabilitatea dorită, x reprezintă dimensiunea insertului, y – dimensiunea genomului haploid, iar N – numărul necesar de recombinanți. Expresia poate fi reprezentată și sub forma:

$$V = \left[\left(1 - \frac{x}{L} \right) f \right]^N,$$

unde P , N și x au aceleași semnificații, iar f – fracțiunea corespunzătoare din genom și L – lungimea medie a fragmentelor.

Astfel, pentru o probabilitate de 99% de obținere a tuturor clonelor de 20 kpb ar fi nevoie de circa 8×10^5 colonii/experiment; validitatea se testează prin hibridizarea prin sondaj a circa 10^2 colonii, cu sonde moleculare obținute prin *nick*-translație. Deoarece în ADN genomic al mamiferelor există un mare număr de secvențe repetate, circa 80% din clone vor fi pozitive după hibridizare.

În general, pentru genomul celulelor eucariote se recurge la o bancă de clone ADNc, ca urmare a particularităților structurale ale majorității acestora (existența exonilor și intronilor). Prin termenul de „clonă ADNc” se descrie o celulă bacteriană

transformată de un vector conținând copia ADN a unei molecule ARNm. Obținerea acesteia presupune reverstranscrierea cu realizarea ADNc, care apoi va fi integrat la situsul de clivaj al unei (unor) restrictaze într-un vector adecvat.

De obicei, o bancă completă de clone ADNc conține mai puține clone decât o bancă de clone genomice: o celulă EK are 10–30 000 secvențe (molecule) ARNm diferite, pe când genomul EK tipic conține suficientă informație pentru 10^5 – 10^6 fragmente de ADN cu dimensiuni corespunzătoare clonării genomice. Frecvența de apariție a unei clone particulare într-o bancă este proporțională cu abundența sa. În funcție de tipul de celulă cu care se operează, va predomina una sau alta dintre speciile ARNm. Capacitatea celulelor bacteriene de a exprima mesajul este o cerință absolută, dacă scopul clonării este obținerea proteinelor corespunzătoare.

Numărul total de secvențe ARNm diferite dintr-o populație poate fi apreciat prin hibridizarea unui exces de ținte cu ADN genomic înalt marcat, cu determinarea fracției ADN care a format un hibrid ADN:ARN; astfel de experimente de „saturare” au fost efectuate pe diferite celule, cum ar fi cele de tutun, HeLa etc. Complexitatea secvenței se calculează pe baza vitezei de hibridizare, fiind exprimată prin valoarea *Rot* (cu ARNm citoplasmatic total și cu reprezentarea gradului de hibridizare în funcție de concentrația ARNm și de timp). Pe această bază s-a calculat abundența speciilor ARNm (tabelul 13):

Tabelul 13

Abundența și complexitatea ARNm din celulele EK tipice

Clasa de abundență	Fracția ARNm din populația clasei	Numărul de secvențe ARNm diferite în clasa de abundență	Numărul de copii/celulă a fiecărui ARNm
mare	22 %	30	3 500
medie	49 %	1 090	230
mică	29 %	10 670	14

Cantitatea de ARNm necesară pentru obținerea unei bănci de clone complete depinde – între altele – de eficiența fiecărei etape din procesul de clonare. Astfel, dacă ARNm izolat din celule sau țesuturi reprezintă 1–2 % din populația de ARN total, la o eficiență de transformare de 10^6 – 10^7 recombinări/ μ g ARNm, ar fi necesare 10 μ g ARNm pentru obținerea a 10^5 – 10^6 clone. Îmbunătățirea eficienței de recombinare și transformare duce la scăderea necesarului de ARNm total. Pentru păstrarea integrității ARNm trebuie:

– aleasă cu grijă metoda de izolare, pentru reducerea activității RNazice (de exemplu, folosind izocianat de guanidină ca atare sau în combinație cu dietilpirocarbonat etc.), apoi trebuie

- eliminat ADN;
- separat ARN poliadenilat (prin cromatografie de afinitate, cu substraturi de tip poliU sau polidT);
- construit ADNc, prin reverstranscriere.

Screening-ul băncii de gene/clonă ADNc se realizează în două etape, în scopul identificării existenței unei anumite secvențe:

- hibridizarea *in situ* a coloniilor bacteriene lizate, cu ajutorul sondelor ARN(m) marcate „cald” (izotopic), cu sau fără îmbogățirea în ARNm. Dimensiunea medie a ARNm EK este de 2 000 b, dar de fapt masa se află într-un larg clopot Gauss (de la 650 b pentru globină la 1 800 b pentru ovalbumină, ajungând la 6 500 b pentru vitelogenină). Se mai poate face apel la îmbogățirea doar în anumite specii de ADNc, corespunzătoare unor ARNm speciali, folosind PCR cu primeri de dimensiuni și secvențe prestabilite (circa 11 nucleotide);

- ADN plasmidial din clonele individuale selectate ca potențiale posesoare ale secvenței căutate, cu un înalt grad de puritate, poate fi analizat prin: electroforeză în gel de agaroză pentru aprecierea masei moleculare, analiză de restricție, determinare de secvență etc. Pentru specii abundente de ARNm se poate recurge și la identificarea – prin electroforeză sau Western-blot – a produsului lor de exprimare (cel mai adesea, sub forma unui produs de fuziune, pentru obținerea unei cantități suficiente de material).

7.10. PERSPECTIVE

Cât de sigure sunt toate aceste scheme de manipulare genică sau de tratament? Asupra securității transferului de gene mediat de vectori retrovirali s-au făcut numeroase considerații. Deocamdată nici la maimuțele supuse experimentelor de terapie genică, nici la pacienții umani tratați nu s-au înregistrat efecte secundare atât de grave care să prevaleze asupra efectelor benefice și nici nu s-au observat efecte patologice. Totuși, la câteva maimuțe s-a descris apariția unor limfoame maligne după un transplant de măduvă osoasă și după un transfer de gene cu un preparat retroviral contaminat cu un virus helper, care a fost direct incriminat pentru dezvoltarea neoplaziei. De aici necesitatea, statuată de către FDA, de a lucra cu vectori *helper-free*.

Aspectele etice și sociale ale terapiei genice au fost intens discutate, de la bun început, în publicații de maxim impact științific (*Nature*, *Human Gene Therapy*, *Journal of Medical Philosophy*), iar în prezent există un consens general că terapia genică a celulelor somatice pentru tratarea unor maladii extrem de serioase și severe constituie o opțiune terapeutică etică. Problema devine tot mai complicată și este încă în controversă, dacă se poate interveni la nivelul celulelor germinative, deoarece se ridică atât probleme medicale, cât și etico-filosofice. În lumea medicală există un consens că manipulările genetice la nivelul celulelor germinative ar produce prejudicii generațiilor viitoare, medicina fiind încă – totuși – o știință cu limite. Tratamente inadecvate ar putea provoca efecte secundare pe termen lung.

În afara argumentelor pur medicale, sunt și argumente filosofice, etice și chiar religioase, cum ar fi cele legate de dreptul de moștenire a unui genom nemanipulat.

Discuții aprinse au avut loc și cu privire la ideea de a transfera unor indivizi umani gene pentru „îmbunătățirea” unor caracteristici. S-a spus că a corecta un defect genic care provoacă o boală serioasă – incompatibilă cu viața – este una, iar a încerca să corectezi sau să modifice o caracteristică de genul înălțimii prin administrarea genei pentru hormonul de creștere, este cu totul altceva. Apare problema definirii binelui: gena dată pentru tratarea sau prevenirea unei boli, versus gena administrată pentru performanță.

În 1997 a început un program care urmărește o cercetare specifică în domeniul tratamentului cancerului, prin manipularea de parvovirusuri recombinante, care s-a demonstrat că inhibă creșterea tumorilor pe model animal (murin). Posibilitatea transferului acestei terapii la om reclamă, bineînțeles, studii corespunzătoare. S-a luat în considerare remarcabila activitate antitumorală pe care o manifestă unele parvovirusuri specifice rozătoarelor, pe baza cărora au fost creați vectori pentru introducerea în celulele tumorale a unor antioncogene și/sau pentru activarea antioncogenelor celulare proprii din tumori. Astfel, parvovirusul H1 a fost „inginerizat” așa încât să conțină gena IL-2; utilizarea acestui vector recombinat a dus la o reducere de 90% a apariției tumorilor, iar exprimarea IL-2 a dus la dispariția celulelor tumorale.

O altă perspectivă o oferă – în domeniul vaccinurilor – bacteriile lactice, germeni saprofiți ai intestinului uman, utilizați în industria alimentară pentru producerea laptelui acru sau a iaurtului. În aceste condiții, un vaccin bazat pe *Lactobacillus* ar putea fi deosebit de sigur și ușor de administrat pe cale orală, ca „pilulă vaccinală”. Modificarea patrimoniului genetic al bacteriei respective, așa încât să producă antigene cu potențial imunizant ar duce la vaccinuri relativ ieftine, potrivit cu o gamă largă de utilizatori de vârste diferite (de la copii la vârstnici).

De asemenea, pornind de la perceptul că este mai bine să previi decât să tratezi, s-a lansat ideea unor cercetări privind prevenirea unor boli ereditare la copii. Pe de altă parte, se speră ca programul „Genomul Uman” să aibă un impact major asupra domeniului sănătății, în care se urmărește nu numai identificarea genelor responsabile de o anumită disfuncție genică sau de o boală, ci și înțelegerea mecanismelor prin care acestea produc maladia. O direcție de mare interes o reprezintă studiile mecanismului morții neuronilor în atacul cerebral și în bolile neurodegenerative (de exemplu, în maladia Alzheimer).

În general, cât de mare este impactul terapiei genice asupra practicii medicale? Nu prea mare, câtă vreme tehnicile utilizate prevăd prelevarea celulelor de la pacient, inserarea genei dorite, reinocularea celulelor „inginerizate” la același individ. Procedul este mult prea dependent de tehnologiile specializate, este foarte scump și nu poate fi utilizat decât în centre foarte bine echipate cu personal și materiale, ceea ce face ca doar câțiva indivizi cu anumite anomalii genetice să poată beneficia de tratament.

Idealul ar fi construirea unor vectori care să permită obținerea unor recombinări cu administrare directă, ca insulina! Pentru aceasta ar trebui o „inginerizare” complexă a vectorilor, care să le confere tropism pentru celule bine precizate; de asemenea, este necesară inserția informației la un loc sigur în genom, care să asigure

și reglarea de către semnale fiziologice normale. Când vor apărea vectori eficienți de acest tip – retrovirali, virali, sintetici sau o combinație a lor – atunci abia terapia genică va avea un larg impact medical în practică.

Studiile efectuate în ultimii ani pe animale au arătat că celulele embrionare *stem* (de bază, sușă) au o mare versatilitate. În funcție de condițiile de cultivare în laborator și de substanțele adăugate în mediu, ele urmează o anumită cale de diferențiere, putând oferi „la schimb” material pentru corectarea unor lipsuri și/sau deficiențe, în măsura în care au fost „inginerizate” în prealabil (adică în patrimoniul lor genetic au fost introduse – prin tehnologia ADN recombinat – informațiile adecvate). Cercetările și modificările la nivelul celulelor *stem* ridică mari probleme de etică, nu numai probleme tehnice și de manipulare.

Vaccinurile recombinante vii, derivate din genomul vaccinia, și-au dovedit eficacitatea, conferind protecție maimuțelor din genul *maccacus* față de retrovirusurile simiene de tip D. Un virus vaccinia recombinat, conținând gena glicoproteinei virusului rabic, a fost testat cu succes în Belgia. Poate cea mai bună utilizare a vectorilor de acest tip este aceea a recombinanților care conțin gena proteinei de anvelopă a HIV, recombinanți aflați în faza I de testare clinică. Unul dintre avantajele acestui tip de vectori are la bază eradicarea variolei, ceea ce face ca în populația umană să nu existe varianta sălbatică și să nu se pună problema recombinării genetice.

Construirea organismelor himeră, care conțin și exprimă informații genetice de la specii care în mod obișnuit nu intră în recombinare, ridică o serie de probleme. Tehnica respectivă permite o îmbogățire a cunoașterii, greu de obținut pe alte căi: caracterizarea structurii cromozomale eucariote, construirea unor hărți cromozomale complete, descifrarea reglării genice, precum și stabilirea structurii primare a fragmentelor ADN implicate în exercitarea diferitelor funcții etc.

MĂSURI DE PROTECȚIE

O dată cu introducerea în laboratoare a tehnologiei ADN recombinat și cu apariția primelor organisme-himeră, s-a ridicat și problema *biohazardului*, adică a eventualității ca – prin tehnici de protecție inadecvate sau prin manipulări incorecte – informația genetică modificată să pătrundă în mod accidental în mediul înconjurător, cu consecințe greu de apreciat pentru om, plante, animale. De aceea, cercetările de tehnologie a ADN recombinat trebuie să se supună unor reglementări stricte.

În acest sens, există două nivele de protecție:

- *protecția biologică*, ce se referă la utilizarea unor vectori și gazde care, prin mutații, au fost astfel inginerizate încât să nu poată supraviețui în afara condițiilor de laborator;

- *protecția fizică*, ce face apel la utilizarea unor laboratoare special amenajate, având dispozitive tehnice de manipulare care să asigure securitatea atât a celor care lucrează, cât și a publicului și mediului.

8.1. MĂSURI DE PROTECȚIE BIOLOGICĂ

Potențialul de biohazard al moleculelor de ADN recombinat a fost discutat pentru prima oară în cadrul reuniunii internaționale de la Asilomar (California, S.U.A., 1975), când a fost elaborat și primul ghid de protecție privind desfășurarea cercetărilor în domeniu. Ulterior, un număr tot mai mare de țări au adoptat propriul lor cod de reguli, în vederea asigurării unei securități maxime pentru societate și mediu.

Măsurile de protecție biologică impun alegerea sistemului vector-gazdă care să permită evitarea biohazardului. Vectorul nu trebuie să se poată mobiliza la întâmplare sau să-și realizeze propriul transfer, fiind mobil; de asemenea, el nu trebuie să aibă gene inductoare de efecte nedorite. Tehnologia ADN recombinat este activă în sisteme diverse vector-gazdă: procariote, eucariote inferioare și superioare (inclusiv omul). De regulă, celulele-gazdă, mai ales microorganismele, sunt supuse unor „mutilări”, devenind „infirmе” (*crippled*), adică nu se pot replica în afara condițiilor de laborator.

Pentru evitarea biohazardului, replicarea și exprimarea ADN recombinat – cu sau fără gene potențial periculoase – nu se face în orice fel de gazdă, astfel încât alegerea acesteia constituie o etapă esențială în designul experimental. Majoritatea cercetărilor în domeniu se efectuează pe *E. coli*, din mai multe rațiuni, în primul rând cunoașterea profundă a biologiei moleculare a bacteriei. Pe de altă parte, biotipul *E. coli* este răspândit în natură sub forma a cel puțin 1 000 de tulpini, cele mai multe nepatogene, adică nu dau infecții prin proliferare în intestinul gros al animalelor cu sânge cald, dar unele sunt patogene, având factori de virulență. Anumite tulpini de *E. coli* dau infecții urinare sau infectează țesuturi de altă natură, la organisme deja tarate (în special la imunodeficienți). În intestinul gros se ajunge chiar la 10^6 – 10^8 celule de *E. coli*/g conținut intestinal, spre deosebire de 10^2 în partea superioară a tubului digestiv.

La *Enterobacteriaceae* există diferiți factori de virulență, cei mai cunoscuți fiind două componente de suprafață, una proteică și una polizaharidică. Cea mai interesantă este componenta glucidică, un complex format dintr-un lipid (unic, nespecific), un miez oligozaharidic (specific tuturor tulpinilor de *E. coli*) și un polizaharid specific (O). Factorul O (care dă coloniilor un aspect neted, *smooth S*) poate fi suprimat prin mutația genei respective, iar bacteria capătă un caracter fenotipic rugos (*rough R*), devenind nepatogenă. Mutanții *R* sunt preferați în cercetările de tehnologie a ADN recombinat. Tot din această categorie fac parte antigenele capsulare, de tip K. Structura glucidică a acestor antigene este diferită în funcție de tulpină, constituind baza specificității antigenului O. Mutațiile care afectează sinteza catenei laterale a acestuia determină obținerea de bacterii rugoase, mai sensibile la acțiunea bactericidelor, mai ușor de fagocitate, mai puțin virulente.

Pentru clonarea genelor se folosesc doar unele tulpini de *E. coli*, majoritatea derivate de la *E. coli* K12. Aceasta a fost izolată din fecalele unui pacient (S.U.A., 1922), dar prin pasaje succesive în laborator și-a pierdut proprietatea de a coloniza intestinul și de a fi patogenă, deoarece a devenit incapabilă să producă un lipopolizaharid normal. Tulpina respectivă are o genă *rfb* (responsabilă de structura catenelor polizaharice ramificate) modificată, ceea ce a dus la pierderea virulenței. S-a arătat că fenotipul neted (*S*) reclamă ca unitatea catenei glucidice a antigenului O să fie repetitivă, proprietate controlată de către gene *rfc*.

În experimente simple, *E. coli* K12 este ușor de modificat, dând naștere la sisteme *EK1(B1)*, cu mutații adiționale față de parental. Acestea nu colonizează intestinul animalelor cu sânge cald și nu pot supraviețui în afara condițiilor specifice de laborator. Prima mutație este *thyA*, care determină creșterea bacteriei dependent de timină sau timidină, ca precursori de acizi nucleici. S-a introdus de asemenea și o mutație *β-gal*, care induce apariția unui aspect și mai rugos și favorizează transformarea, datorită deleției galactozei din lipopolizaharid. O altă mutație este *recA*, vizând sistemul de recombinare a bacteriei, ceea ce duce la sensibilizarea acesteia la lumină solară în general, la UV în special etc. De asemenea, pentru a se replica, tulpinile *EK1* sunt dependente de prezența anumitor aminoacizi, ceea ce le reduce cultivabilitatea în condiții improprii.

Sistemul *EK2* (*B2*) este superior celui prezentat anterior, fiind utilizat în cercetări de risc ridicat, întrucât au „mutări” suplimentare. Astfel, se aplică mutația *dap⁻*, celulele reclamând pentru cultivare acidul diaminopimelic (DAP). Alte șase mutații la acest nivel de protecție biologică determină sensibilitate sporită la antibiotice, bacteriostatice, detergenți (inclusiv la acizii biliari), UV, lumină solară etc. Cea mai folosită este tulpina *E. coli* χ 1776, izolată inițial de la un pacient. În absența DAP celulele lizează, efectul letal fiind facilitat de o mutație suplimentară, care împiedică sinteza acidului colanic din constituția polizaharidului capsular.

Sistemul *EK3* (*B3*) este derivat din *EK2*, care este supus unor teste de verificări suplimentare a particularităților sale. El folosește la clonarea unor gene cu potențial de hazard, cum ar fi oncogenele.

În afară de *E. coli*, în tehnologia ADN recombinat s-au mai introdus ca gazdă și alte bacterii, cum ar fi *Bacillus subtilis*, izolat din sol. În general, acesta este nepatogen, dar poate produce infecții locale la nivelul unor organe lezate (ochi) sau atacă gazde imunocompromise. *B. subtilis* prezintă avantajul unei frecvențe înalte de transformare, iar biologia sa moleculară este din ce în ce mai bine cunoscută. În celulele sale au fost identificate unele elemente extracromozomale, de tipul unor plasmide criptice; există de asemenea unii bacteriofagi specifici. Aceste elemente pot fi folosite ca vectori pentru inserția de gene noi. În plus, plasmidele de tip *Col E* se pot replica în *B. subtilis*. Ca dezavantaj în lucrul cu această bacterie, se poate menționa faptul că nu au fost create tulpini care să nu poată supraviețui în afara laboratorului.

8.2. MĂSURI DE PROTECȚIE FIZICĂ

În funcție de gradul de pericolozitate al experimentelor, au fost statuate patru tipuri de laboratoare, pentru ca microorganismele să nu fie diseminate în afară. Întrucât se lucrează cu bacterii și cu virusuri, există un sistem de protecție, dar în afara unor măsuri de rutină se impun și reglementări speciale. Persoanele care lucrează, inițiate și instruite în tehnici aseptice, trebuie să înțeleagă și să evalueze potențialul de biohazard. Laboratoarele sunt repartizate în patru grade de securitate:

- **P1** (grad minim) asigură protecția oferită în mod curent de un laborator de microbiologie/virusologie. Se utilizează tulpini standard *E. coli* K12;

- **P2** (grad scăzut) dă o protecție similară cu cea conferită de un laborator P1, îmbunătățit prin asigurarea filtrării aerului ieșit din laborator, asigurarea unei ventilații continue cu aer filtrat. Implică existența unor cabinete de lucru cu presiune negativă (care să împiedice răspândirea microorganismelor în incinta laboratorului în mod accidental). Microorganismele gazdă sunt variante de *E. coli* χ 1776;

- **P3** (grad moderat) recomandă amenajarea unor spații speciale, separate de restul unităților, având sisteme proprii de sterilizare; laboratoarele sunt dotate cu

pereți, pardoseală, tavan ușor lavabile, iar în interiorul lor presiunea trebuie să fie peste tot negativă;

– P4 (grad înalt) vizează o construcție specială, monolit, izolată în mod deosebit. Are ecluze-tunel de intrare-ieșire, cu control suplimentar al contaminării materialelor/oamenilor și cu posibilitatea de decontaminare totală a celor care lucrează în incintă.

În 1975, la Asilomar (California) s-au întâlnit, sub conducerea lui Berg, oameni de știință care au discutat problema biohazardului. În 1976 s-au introdus primele recomandări ale NIH (*National Institute of Health*), care se refereau la măsurile de protecție biologică și fizică, pentru evitarea riscului de contaminare. Ulterior, și alte țări au adoptat un cod de lucru, dar după 1982 măsurile de protecție fizică s-au mai îmblânzit.

O privire retrospectivă asupra începuturilor tehnologiei genetice și, prin aceasta, asupra conferinței de la Asilomar, permite să se observe că – pe atunci noua tehnologie – a fost înțeleasă de către oamenii de știință participanți ca o obligație și în același timp ca o responsabilitate pentru inițierea unor dezbateri asupra oricăror probleme posibile, imaginate.

Tehnologia genetică (tehnologia ADN recombinat) a fost deseori descrisă și apreciată ca o revoluție științifică, dar – între timp – s-a ajuns la calea unei evoluții istorice. În căutarea premiselor pentru noi combinații *in vitro* a acizilor nucleici s-a efectuat un deosebit de spectaculos salt al cunoașterii.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Adams M.D., Celniker S.E., Holt R.A., Evans C.A., Gocayne J.D., Amanatides P.G., Scherer S.E. și colab. (2000), *The genome sequence of Drosophila melanogaster DNA*, Science, **287**, pp. 2185–2195.
2. Adhya S., Gottesman M.A., de Crombrughe B. (1974), *The terminal polyA sequences in rabbit messenger DNA*, aProc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **71**, pp. 2534–2538.
3. Alberts B., Barry J., Davies M., Hama-Inaba H., Linn C., Mace D., Moran L., Morris C., Piperno J., Sinha N. (1977), *Nucleic acid-protein recognition*, ed. H. Vogel, Acad. Press (NY), pp. 31–45.
4. Andersen J.B., Sternberg C., Poulsen L.K. și colab. (1998), *New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria*, Appl. Environ. Microbiol., **64**, pp. 2240–2246.
5. Andersen W. F. (1984), *Prospects for human gene therapy*, Science, **226**, p. 401–409.
6. Andrus A. (1995), *PCR2. A practical approach*, ed. M.J. McPherson, B.D. Hames, G.R. Taylor, IRL Press, Oxford–New York–Tokyo, pp. 39–54.
7. Alt-Moerbe, J., Rak B., Schroeder J. (1986), *A 3.6 kbp segment from the vir region of Ti plasmid contains genes responsible for border sequence-directed production of T-region circles in E. coli*, EMBO J., **5**, pp. 1129–1135.
8. Arber W. (1965), *Host specificity of DNA produced by E. coli. X. The role of methionine in the production of host specificity*, J. Mol. Biol., **11**, pp. 247–257.
9. Arber W., Dussoix D. (1962), *Host specificity of DNA produced by E. coli. II. Control over acceptance of DNA from infecting phage λ* , J. Mol. Biol., **5**, pp. 18–36.
10. Arber W., Linn S. (1969), *DNA modification and restriction*, Annu. Rev. Biochem., **38**, pp. 467–481.
11. Avery O., McLeod C.M., McCarthy M. (1944), *Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus type III*, J. Exp. Med., **78**, pp. 137–145.
12. Baechi B., Reiser J., Pirrotta V. (1979), *Methylation and cleavage sequences of the Eco P1 restriction-modification enzyme*, J. Mol. Biol., **128**, pp. 143–163.
13. Baltimore D. (1976), *Viruses polymerases and cancer*, Science, **192**, pp. 632–636.
14. Barsov E.V., Payne W.S., Hughes S.H. (2001), *Adaptation of chimeric retroviruses in vitro and in vivo: isolation of avian retroviral vectors with extended host-range*, J. Virol., **75**, pp. 4973–4983.
15. Beadle G.W., Tatum E.L. (1941), *Genetic control of biochemical reactions in Neurospora*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **27**, pp. 499–506.
16. Berg P., Baltimore D., Boyer H.W., Cohen S.N., Davis R.W., Hogness D.S., Nathans D., Roblin R., Watson J.D., Weissman S., Zinder N.D. (1974), *Potential biohazards of recombinant DNA molecules*, Science, **185**, pp. 303–305.
17. Berg A.J., Sharp P.A. (1977), *Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids*, Cell, **12**, pp. 721–732.
18. Bernt K., Liang M., Ye X., Ni S., Li Z.Y., Ye S.L., Hu F., Lieber A. (2002), *A new type of adenovirus vector that utilizes homologous recombination to achieve tumor-specific replication*, J. Virol., **76**, pp. 10994–11002.

CONTENTS

Introduction	11
1. Nucleic acid-protein relationships	17
1.1. Specific features in prokaryotic cells	19
1.2. Specific features in eukaryotic cells	22
1.3. Eukaryotic gene expression in a prokaryotic system	28
2. Transfer of the genetic information	31
2.1. Genetic information transfer in prokaryotic cells	31
2.1.1. Genetic recombination	31
2.1.2. Transformation	32
2.1.3. Conjugation	33
2.1.4. Transduction	34
2.1.5. Transfection	35
2.1.6. Recombinant DNA technology	35
2.2. Genetic information transfer in eukaryotic cells	36
2.2.1. Cell hybridization	36
2.2.2. Minicells	37
2.2.3. Nuclei mediated genetic transfer	37
2.2.4. Chromosome mediated genetic transfer	38
2.2.5. Purified DNA mediated genetic transfer	39
2.2.6. Recombinant DNA technology	39
2.3. General flowchart of the recombinant DNA technology	39
2.3.1. Initial flowchart	40
2.3.2. Current flowchart	41
3. Enzymes used in the recombinant DNA technology	43
3.1. Nucleases	43
3.1.1. Unspecific nucleases	43
3.1.2. Specific nucleases	47
3.2. Polymerases	53
3.2.1. DNA polymerases	53
3.2.2. RNA polymerases	56
3.3. Ligases	57
3.4. Other enzymes	59
3.4.1. DNA methyl transferases	59
3.4.2. Pronase E	60
3.4.3. Proteinase K	61
3.4.4. Alkaline phosphatases	61

3.4.5. Polynucleotid kinase	62
3.4.6. Topoisomerase I	62
4. Vectors	64
4.1. Plasmids	64
4.1.1. Plasmids properties	65
4.1.2. Plasmidial vectors	67
4.1.3. Plasmidial expression vectors	74
4.1.4. Other types plasmidial vectors	76
4.1.5. Shuttle vectors	77
4.2. Phage vectors	79
4.2.1. Bacteriophage λ	79
4.2.2. Vectors derived from phage λ genome	84
4.2.3. Vectors derived from filamentous phages genome	86
4.2.4. Phagemides	90
4.2.5. Cosmids	92
4.3. Eukaryotic viral vectors	95
4.3.1. Criteria for a mammalian viral vector design	95
4.3.2. Vectors derived from adeno viruses	96
4.3.3. Vectors derived from Epstein-Barr virus (EBV)	98
4.3.4. Vectors derived from herpes simplex 1 virus (HSV1)	101
4.3.5. Vectors derived from simian vacuolizant virus 40 (SV40)	106
4.3.6. Vectors derived from papillomaviruses (PV)	111
4.3.7. Vectors derived from poxviruses	112
4.3.8. Retroelements	115
4.3.9. Vectors derived from retroviral genome	116
4.3.10. Vectors derived from baculoviruses	122
4.3.11. Vectors derived from caulimoviruses	127
4.4. Vectors derived from yeast	128
4.5. Ti plasmid	134
5. Passenger	138
5.1. Obtaining methods	138
5.1.1. Mechanical methods	138
5.1.2. Enzymic methods	139
5.1.3. Chemical methods	144
6. Method for the detection of the recombinant DNA presence	151
6.1. Techniques for the DNA detection	152
6.1.1. Enzymic restriction	152
6.1.2. Nucleic acid hybridization	153
6.1.3. Polymerase chain reaction (PCR)	154
6.1.4. Sequencing	155
6.2. Techniques for the protein detection	160
6.2.1. Western blot analysis	161
6.2.2. ELISA	161

	211
7. Applications	162
7.1. Somatostatin obtaining	163
7.2. Insulin obtaining	165
7.3. Urokinase obtaining	166
7.4. Anti viral hepatitis B vaccin obtaining	166
7.5. Anti rabic vaccin obtaining	168
7.6. Human gene therapy	170
7.6.1. ADA therapy	176
7.6.2. Gene therapy in cancer	177
7.7. Transgenic plants	182
7.8. Transgenic animals	186
7.8.1. Methods used for the foreign gene transfer to animals	187
7.9. Gene bank	192
7.10. Perspectives	195
8. Protection methods	198
8.1. Biological protection methods	198
8.2. Physical protection methods	200

ISBN 973-27-0989-8

